

GRACIELE FERNANDA DE SOUZA PINTO

**FITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS INSPIRADAS
EM MOLÉCULAS NATURAIS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS HERBICIDAS**

ASSIS

2024

GRACIELE FERNANDA DE SOUZA PINTO

**FITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS INSPIRADAS
EM MOLÉCULAS NATURAIS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS HERBICIDAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Doutora em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientadora: Dra. Rosana Marta Kolb

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

ASSIS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

P659f Pinto, Graciele Fernanda de Souza
Fitotoxicidade de substâncias naturais e sintéticas
inspiradas em moléculas naturais para a descoberta de novos
herbicidas / Graciele Fernanda de Souza Pinto. — Assis, 2024
91 f. : il.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientadora: Profa. Dra. Rosana Marta Kolb

1. Herbicidas. 2. Herbicidas - Toxicologia. 3. Planta
daninha. 4. Agricultura. 5. Produtos químicos agrícolas.
I. Título.

CDD 668.654

ATA DA DEFESA EM SESSÃO FECHADA DA TESE DE DOUTORADO DE GRACIELE FERNANDA DE SOUZA PINTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CÂMPUS DE ASSIS.

Aos 11 dias do mês de abril do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de GRACIELE FERNANDA DE SOUZA PINTO, intitulada **FITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS INSPIRADAS EM MOLÉCULAS NATURAIS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS HERBICIDAS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ROSANA MARTA KOLB (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/FCL - Assis/SP, Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual) do(a) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas / UNESP/IBILCE - São José do Rio Preto/SP, Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / UNESP/IB - Botucatu/SP, Dr. KASSIO FERREIRA MENDES (Participação Virtual) do(a) UFV - Viçosa/MG, Dr. FRANCISCO CLAUDIO LOPES DE FREITAS (Participação Virtual) do(a) UFV - Viçosa/MG. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ROSANA MARTA KOLB

Rosana Marta Kolb

Dedico este trabalho à Santíssima Trindade

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às pessoas e instituições que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Rosana Marta Kolb, por sua persistência em mim e por acreditar nos meus sonhos, mesmo quando eu mesma duvidava deles. Seu apoio e orientação foram essenciais para este trabalho.

Ao Professor Luis Octavio Regasini, expresso minha sincera gratidão por seu acolhimento e por todos os ensinamentos acadêmicos que compartilhou comigo. Você é parte integrante da minha jornada acadêmica.

À minha família, especialmente à minha mãe, irmãos e sobrinhos, e em memória do meu pai, agradeço por serem meu impulso e estímulo constantes. Vocês são parte indissociável de quem sou, e amo cada um de vocês profundamente.

Aos meus amigos, cujo apoio foi inestimável ao longo deste percurso, expresso minha mais profunda gratidão. A todos aqueles que me ouviram, consolaram, deram conselhos e estenderam os braços para mim, meu mais sincero obrigada. Em especial, quero agradecer aos companheiros do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFEP) e aos amigos que a vida me presenteou, Mírian, Maria Cristina, Julio, Adolfo e Jakson, assim como aos ex-alunos do Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM). Cada um de vocês fez diferença na minha vida.

Por fim, expresso minha gratidão a todos os servidores da Faculdade de Ciências e Letras - Unesp, Câmpus de Assis, e do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Unesp, Câmpus de São José do Rio Preto, pelo suporte e apoio prestados.

Não poderia deixar de agradecer a Deus por seu amor constante e pela graça que me concedeu de concluir este estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

GRATIDÃO!

Agora, porém, assim diz Javé, aquele que criou você, Jacó, aquele que formou você, ó Israel: Não tenha medo, porque eu o redimi e o chamei pelo nome; você é meu.

Isaías 43:1

(SOCIEDADE BÍBLICA CATÓLICA
INTERNACIONAL e PAULUS - BÍBLIA SAGRADA,
1990, p. 986)

RESUMO

Neste estudo, foi investigada a fitotoxicidade de extratos de hexano, acetato de etila e metanol a 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 3,17 mg/mL e 5,00 mg/mL, provenientes de folhas das plantas medicinais: *Byrsonima intermedia*, *Moquiniastrum polymorphum*, *Luehea candicans*, *Miconia chamissois* e *Qualea cordata*. Além disso, examinou-se 25 derivados sintéticos de chalconas e 11 derivados sintéticos de curcuminoides, a 1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e 23 diarilaminas derivadas de ácido antranílico, a 1000, 500 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com o objetivo de identificar novas substâncias fitotóxicas. A avaliação dos extratos das plantas medicinais indicou um impacto adverso sobre o crescimento inicial de *Cucumis sativus*. Destaca-se que os extratos de metanol exibiram o efeito inibitório mais pronunciado, exceto para *M. chamissois*, em que o extrato de hexano apresentou maior fitotoxicidade. A análise fitoquímica revelou a presença de alcaloides nas plantas medicinais, sugerindo o potencial dessas substâncias como agentes herbicidas naturais. Quanto aos derivados sintéticos de chalconas e curcuminoides, o estudo identificou uma substância, a 1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona, com potencial fitotóxico a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, algumas substâncias estimularam o crescimento da raiz principal de *Lactuca sativa*. A conformidade dessas substâncias com os critérios estabelecidos para herbicidas sugere sua viabilidade como agentes de baixo impacto ambiental. No entanto, as substâncias demonstraram alta capacidade de atravessar as barreiras intestinal e cerebral em análise *in silico*. Entre as diarilaminas, as substâncias ácido 2-((3,4-dimetoxifenil)amino)benzoico, ácido 2-((4-metoxifenil)amino)benzoico, ácido 2-((3,5-dimetoxifenil)amino)benzoico e ácido 2-((3-metoxifenil)amino)benzoico causaram inibições no comprimento da raiz principal de *Lactuca sativa*, *Raphanus raphanistrum* e *Digitaria insularis* em diferentes concentrações, evidenciando seu potencial fitotóxico. A análise das propriedades físico-químicas das diarilaminas revelou similaridades estruturais com herbicidas comerciais, sugerindo que possam ter relevância para a descoberta de novas substâncias com potencial aplicação no controle de plantas daninhas. Além disso, testes de ecotoxicidade em zooplâncton não indicaram impactos adversos significativos dessas substâncias nas comunidades de organismos aquáticos, sugerindo sua potencial segurança para o ambiente aquático. No entanto, para uma compreensão abrangente de seu potencial e segurança, são necessários estudos adicionais para avaliar sua permeabilidade intestinal e cerebral em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: agricultura; planta daninha; potencial herbicida.

ABSTRACT

In this study, the phytotoxic activity of hexane, ethyl acetate, and methanol extracts at 1.25, 2.5, 3.17, and 5.00 mg/mL from leaves of medicinal plants: *Byrsonima intermedia*, *Moquiniastrum polymorphum*, *Luehea candicans*, *Miconia chamissois*, and *Qualea cordata*, was investigated. Additionally, we examined 25 synthetic derivatives of chalcones and 11 synthetic derivatives of curcuminoids at concentrations of 1000, 100, 10, and 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 23 synthetic derivatives of anthranilic acid at concentrations of 1000, 500, and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, aiming to identify new substances with phytotoxic potential. The evaluation of the extracts from the medicinal plants indicated an adverse impact on the initial growth of *Cucumis sativus*. Notably, the methanol extracts exhibited the most pronounced inhibitory effect, except for *M. chamissois*, where the hexane extract showed higher phytotoxicity. Phytochemical analysis revealed the widespread presence of alkaloids in the medicinal plants, suggesting the potential of these substances as natural herbicidal agents. Regarding synthetic derivatives of chalcones and curcuminoids, the study identified a substance, 1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one, with phytotoxic potential at 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Additionally, some substances stimulate the initial growth of the main root of *Lactuca sativa* at specific concentrations. The compliance of these substances with established criteria for herbicides suggests their viability as agents with low environmental impact. However, the substances demonstrated a high capacity to cross intestinal and brain barriers in *in silico* analysis. Among the synthetic derivatives of anthranilic acid, the substances 2-((3,4-dimethoxyphenyl)amino)benzoic acid, 2-((4-methoxyphenyl)amino)benzoic acid, 2-((3,5-dimethoxyphenyl)amino)benzoic acid, and 2-((3-methoxyphenyl)amino)benzoic acid caused inhibitions in the length of the main root of *Lactuca sativa*, *Raphanus raphanistrum*, and *Digitaria insularis* at different concentrations, evidencing their phytotoxic potential. Analysis of the physicochemical properties of derivatives of anthranilic acid revealed structural similarities with commercial herbicides, suggesting their relevance for the discovery of new substances with potential application in weed control. Additionally, ecotoxicity tests on zooplankton did not indicate significant adverse impacts of these substances on aquatic organism communities, suggesting their potential safety for the aquatic environment. However, for a comprehensive understanding of their potential and safety, further studies are necessary to evaluate their intestinal and brain permeability in *in vivo* models.

Keywords: agriculture; weed; herbicidal potential.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO 1. Phytotoxicity of organic extracts of five medicinal plants of the Neotropical savanna savanna.....	17
1.1 Abstract.....	18
1.2 Introduction.....	19
1.3 Materials and Methods.....	20
1.3.1 Botanical material and extraction method.....	20
1.3.2 Physicochemical attributes of extracts.....	20
1.3.3 Bioassays with organic extracts in <i>Cucumis sativus</i> L.....	21
1.3.4 Preliminary phytochemical analysis.....	21
1.3.5 Statistical analysis.....	21
1.4 Results.....	22
1.4.1 Physicochemical attributes of extracts.....	22
1.4.2 Organic extract bioassays on cucumber seedlings.....	22
1.4.3 Preliminary phytochemical analysis.....	25
1.5 Discussion.....	26
1.6 References.....	29
CAPÍTULO 2. Atividade herbicida de chalconas e curcuminoides no crescimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> L.....	35
1.1 Resumo.....	36
1.2 Introdução.....	37
1.3 Materiais e Métodos.....	38
1.3.1 Obtenção das substâncias sintéticas utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.....	38
1.3.2 Preparação das soluções das substâncias sintéticas utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.....	39
1.3.3 Características físico-químicas das soluções-teste.....	39
1.3.4 Espécie-alvo.....	39

1.3.5 Fitotoxicidade de chalconas e curcuminoides em bioensaio de crescimento inicial.....	41
1.3.6 Biodisponibilidade em plantas e predição da absorção intestinal e cerebral <i>In Silico</i> (ADME) das substâncias sintéticas.....	42
1.3.7 Análise estatística.....	42
1.4 Resultados e Discussão.....	43
1.4.1 Características físico-químicas das soluções-teste.....	43
1.4.2 Triagem e avaliação de chalconas e curcuminoides como modulador de crescimento inicial.....	43
1.4.3 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição da absorção intestinal e cerebral <i>In Silico</i> (ADME) das substâncias sintéticas.....	48
1.5 Conclusão.....	55
1.6 Referências.....	55
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	59
CAPÍTULO 3. Potencial herbicida de diarilaminas derivadas de ácido antranílico.....	61
1.1 Resumo.....	62
1.2 Introdução.....	63
1.3 Materiais e Métodos.....	64
1.3.1 Síntese das substâncias sintéticas utilizadas nos testes de fitotoxicidade.....	64
1.3.2 Preparação das soluções das substâncias utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.....	64
1.3.3 Características físico-químicas das soluções-teste.....	65
1.3.4 Espécie-alvo.....	65
1.3.5 Triagem de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial de alface.....	66
1.3.6 Avaliação do potencial fitotóxico de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial.....	67
1.3.7 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição ADME de diarilaminas derivadas de ácido antranílico.....	67
1.3.8 Avaliação da ecotoxicidade em zooplâncton.....	68
1.3.8.1 Coleta de sedimentos contendo ovos de zooplâncton adormecidos.....	68

1.3.8.2 Efeito de diarilaminas derivados de ácido antranílico na emergência de zooplâncton.....	69
1.3.9 Análise estatística.....	69
1.4 Resultados e Discussão.....	70
1.4.1 Características físico-químicas das soluções-teste.....	70
1.4.2 Triagem de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial de alface.....	70
1.4.3 Avaliação do potencial fitotóxico de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial.....	73
1.4.4 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição ADME de diarilaminas derivadas de ácido antranílico.....	76
1.4.5 Avaliação da ecotoxicidade em zooplâncton.....	78
1.5 Conclusão.....	82
1.6 Referências.....	83
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	87
CONCLUSÃO GERAL.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

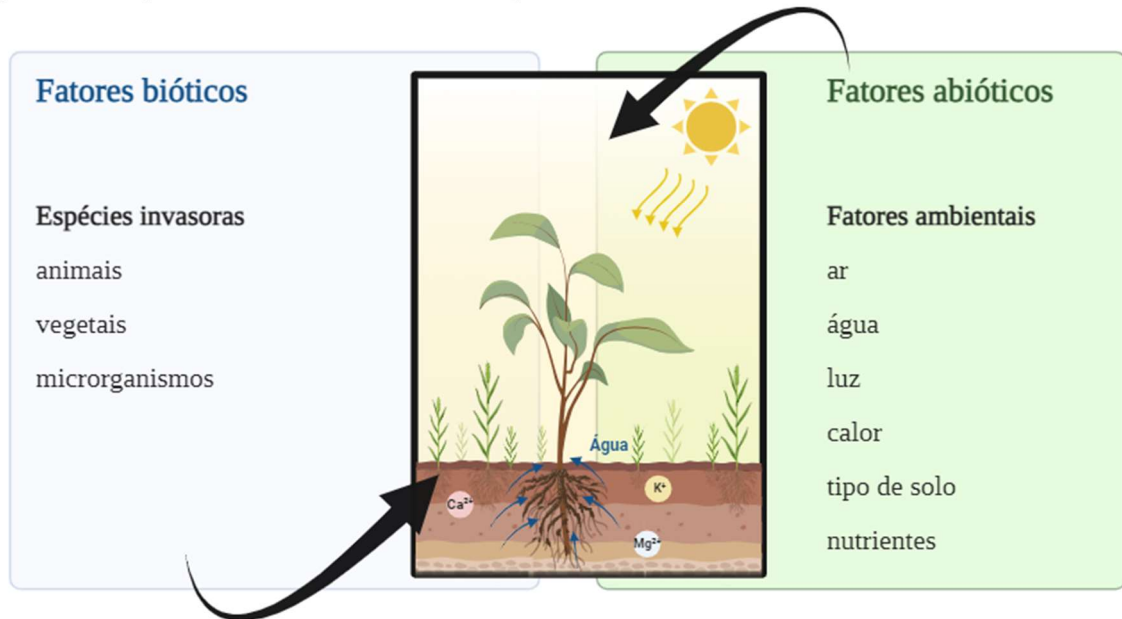
O manejo sustentável de plantas daninhas na agricultura é fundamental para garantir o acesso a alimentos seguros e nutritivos, promovendo uma vida saudável. O setor agropecuário enfrenta muitos desafios para suprir as demandas alimentares da população mundial que vêm crescendo demasiadamente. Projeções indicam que a população mundial aumentará em aproximadamente 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos, chegando a 9,8 bilhões em 2050 (Hernandez-Tenorio et al., 2022).

Consequentemente, torna-se cada vez mais complexo alcançar o segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS 2), da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) de eliminar a fome no mundo, especialmente quando associado ao imperativo da sustentabilidade de longo prazo (OECD/FAO, 2022). A agricultura sustentável visa atender às necessidades alimentares da crescente população mundial, enquanto minimiza os impactos da agricultura no ambiente e nos seres humanos, com manutenção da produtividade (Lykogianni et al., 2021).

Para enfrentar os desafios impostos por fatores abióticos e bióticos (Fig. 1), torna-se essencial a adoção de práticas e estratégias agrícolas inovadoras e aprimoradas que garantam a grande demanda por sustentabilidade e produtividade (Khursheed et al., 2022). Dentre as principais limitações bióticas, as plantas daninhas são consideradas as mais prejudiciais para a produção agrícola (Gharde et al., 2018), resultando em perdas significativas de culturas. Estima-se que as plantas daninhas causem uma perda potencial de 34% das culturas agrícolas em todo o mundo, em comparação com 18% e 16% de perdas causadas por pragas e patógenos, respectivamente (Głąb et al., 2017).

O manejo integrado de plantas daninhas é uma abordagem multifacetada que incorpora técnicas físicas, genéticas, biológicas, culturais e químicas para controlar e mitigar infestações em campos agrícolas (Jabran et al., 2015). Embora os agricultores frequentemente recorram a herbicidas sintéticos (não inspirados em substâncias naturais), como solução rápida e eficiente, para garantir a produção de alimentos e reduzir as perdas de rendimento, sua aplicação generalizada torna-se um obstáculo para a sustentabilidade (Lykogianni et al., 2021; Motmainna et al., 2021).

Figura 1. Esquema de interação entre a espécie cultivada e o ecossistema.



Fonte: elaborado pela autora com <https://www.biorender.com/>.

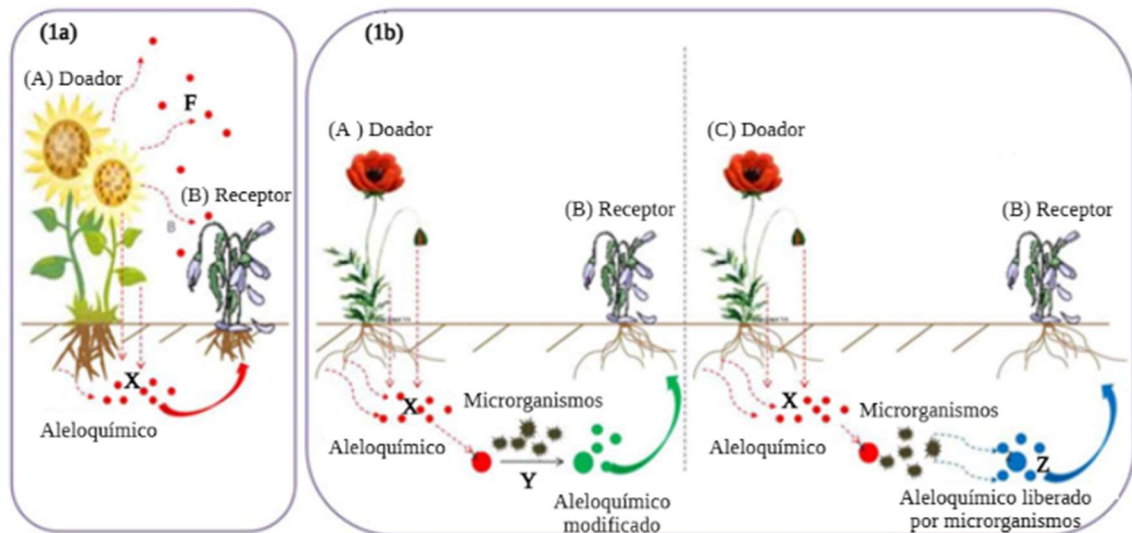
O uso inadequado de herbicidas sintéticos, como a aplicação de doses elevadas e persistentes, utilização em estádios inapropriados do desenvolvimento das plantas daninhas e/ou culturas, bem como condições climáticas desfavoráveis, tem contribuído com a degradação do solo, poluição ambiental, e efeitos adversos na saúde humana e em organismos não alvo. Além disso, a rápida evolução de biótipos resistentes aos herbicidas também é um problema (Lykogianni et al., 2021; Motmainna et al., 2021). Consequentemente, é imprescindível desenvolver novas classes de herbicidas com novos mecanismos e locais de ação para reduzir o uso dos herbicidas sintéticos disponíveis comercialmente (Möhring; Finger, 2022).

Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver soluções inovadoras para a produção segura de alimentos e tendências ecologicamente amigáveis para o manejo de plantas daninhas. Os bioherbicidas, derivados de organismos vivos ou seus metabólitos secundários (também denominados de metabólitos especializados), surgem como alternativas promissoras para suprimir populações de plantas daninhas sem prejudicar o ambiente (Soltys et al., 2013; Scavo e Mauromicale, 2021).

Dentre os métodos ecologicamente sustentáveis de controle de baixo impacto de ervas daninhas, a manipulação dos mecanismos alelopáticos emerge como uma abordagem de destaque (Scavo et al., 2018). A alelopatia (Fig. 2), um fenômeno bioquímico de notável relevância ecológica, engloba os efeitos diretos ou indiretos, sejam benéficos ou prejudiciais, exercidos por uma planta doadora sobre uma planta receptora, por meio da liberação de

substâncias químicas no ambiente (Rice, 1984). Os aleloquímicos, substâncias naturais que se destacam nesse contexto, demonstram um significativo potencial como agentes bioherbicidas, desempenhando um papel central na compreensão da alelopatia, um fenômeno intrínseco às interações entre espécies vegetais, microrganismos ou entre espécies vegetais e microrganismos (Scavo e Mauromicale, 2021).

Figura 2. Múltiplas dimensões das interações alelopáticas entre plantas superiores.



(1a) A planta A libera aleloquímicos X e F, que exercem influência direta sobre o crescimento da planta B. (1b) A planta A libera o aleloquímico X, o qual sofre modificação ou ativação por microrganismos, transformando-se no aleloquímico Y, que afeta o crescimento da planta B. Em outro cenário, a planta C libera o aleloquímico X, estimulando os microrganismos a produzirem o aleloquímico Z, que impacta no crescimento da planta B. Fonte: adaptado de Soltys et al. (2013).

Essas interações ocorrem por meio da síntese de uma ampla variedade de biocomunicadores, tais como ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, ácidos graxos, poliacetilenos, quinonas, compostos fenólicos, ácido cinâmico, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenoides e esteroides (Soltys et al., 2013). Esses metabólitos especializados liberados pelas plantas podem afetar a germinação e o crescimento de plantas vizinhas, interferindo em diferentes processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração e equilíbrio hormonal ou de água (Guo et al., 2018). Como resultado, esses produtos naturais fornecem uma alternativa viável para o desenvolvimento de herbicidas eficazes e ecologicamente corretos, devido a sua alta diversidade estrutural e novos mecanismos de ação (Scavo e Mauromicale, 2021).

Diversos aleloquímicos foram identificados em várias espécies de plantas (Dayan et al., 1997; Bertin et al., 2003; Duke et al., 2007). Um exemplo notável é a sorgoleona, uma substância alelopática presente nos exsudatos da raiz de sorgo (*Sorghum bicolor*), concentrada

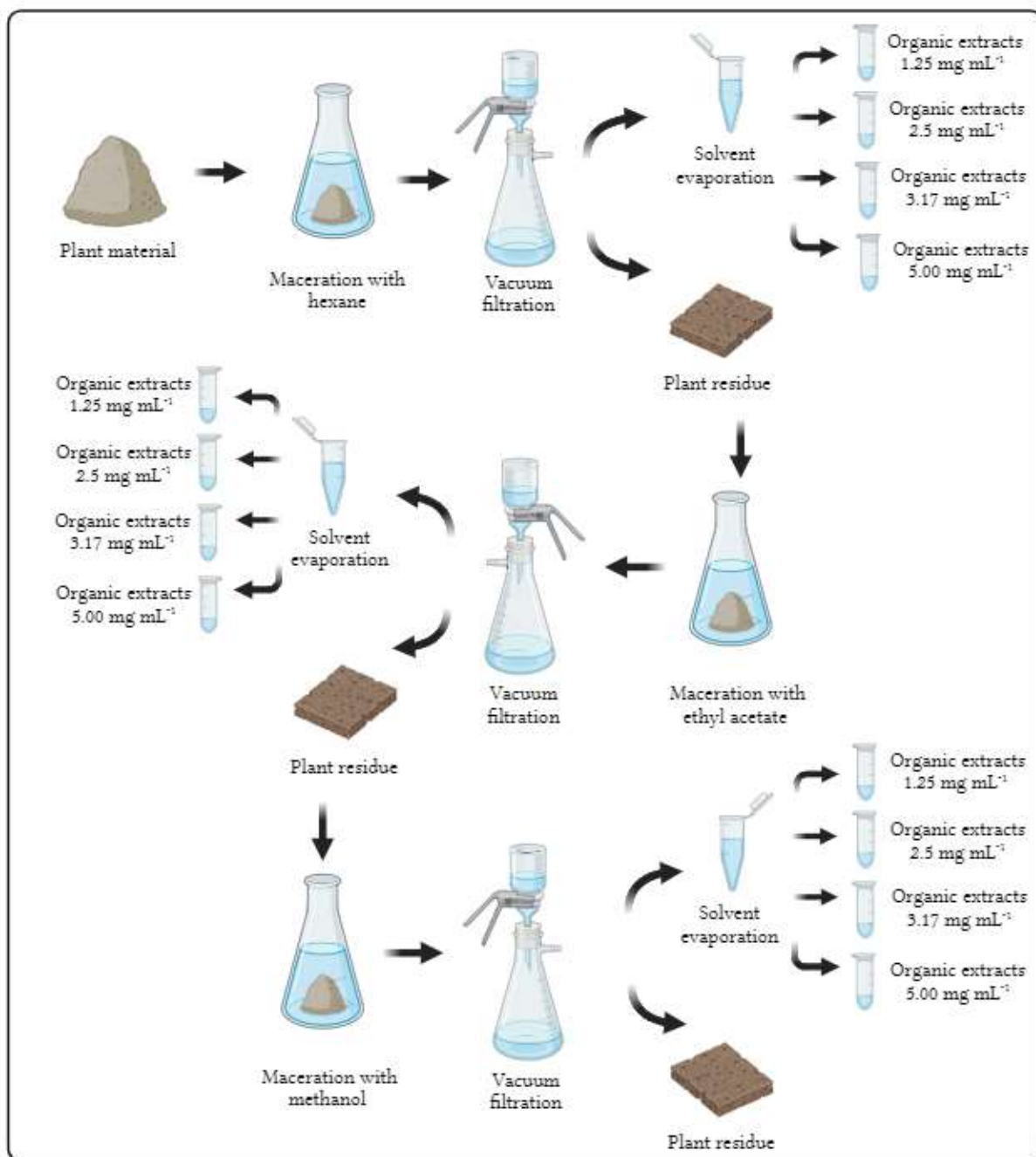
principalmente nos pelos radiculares. Essa substância tem a capacidade de inibir o crescimento de plantas daninhas sem prejudicar as espécies cultivadas, tornando o sorgo uma opção interessante para a rotação de culturas (Amali Jesudas et al., 2014).

Embora extratos de plantas tenham mostrado sucesso no controle de plantas daninhas, a viabilidade econômica dessas soluções tem sido um desafio para sua aplicação em larga escala. Por essa razão, pesquisadores estão centrando esforços no isolamento de substâncias, que apresentem potencial para serem empregadas como bioherbicidas, ou como base para a descoberta de novos produtos por meio de modificações químicas (Duke, 2015). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi de analisar a fitotoxicidade de extratos orgânicos de cinco espécies de plantas sobre o crescimento inicial de uma espécie bioindicadora, bem como verificar os efeitos de 59 substâncias sintéticas inspiradas em substâncias naturais de plantas no crescimento inicial de uma espécie bioindicadora de fitotoxicidade e de plantas daninhas.

O presente estudo está estruturado em três capítulos distintos, cada um deles abordando aspectos específicos da avaliação de substâncias fitotóxicas. No primeiro capítulo, foi avaliado o potencial fitotóxico de extratos orgânicos provenientes de cinco espécies de plantas medicinais. Esses extratos apresentam variações significativas em polaridade e concentração, e sua influência sobre o crescimento inicial de plântulas de pepino foi analisada. Adicionalmente, foi caracterizada a composição química dos extratos orgânicos dessas cinco espécies de plantas, com o intuito de estabelecer correlações entre a composição química dos extratos e os efeitos fitotóxicos observados. No segundo capítulo, foi avaliado o potencial fitotóxico de chalconas e curcuminoides sintéticos (36 substâncias), explorando seu impacto no desenvolvimento inicial de alface. O terceiro capítulo direciona-se à análise da atividade biológica de diarilaminas derivadas de ácido antranílico (23 substâncias), considerando seu efeito no crescimento inicial de uma espécie agrônômica (alface) e duas espécies de plantas daninhas, a saber, nabiça e capim amargoso. Adicionalmente, foi avaliada a ecotoxicidade das substâncias sintéticas com maior fitotoxicidade. Além disso, as propriedades físico-químicas dessas substâncias foram analisadas, para ampliar nossa compreensão sobre a toxicidade dos derivados sintéticos em organismos humanos e o seu potencial uso como herbicidas seletivos.

CAPÍTULO 1

Phytotoxicity of organic extracts of five medicinal plants of the Neotropical savanna



Summary of the Materials and Methods section (figure not included in the journal publication).

Phytotoxicity of organic extracts of five medicinal plants of the Neotropical savanna

*Artigo publicado no periódico Brazilian Journal of Biology, vol. 83, e270122, 2023.

1.1 Abstract

Medicinal plants produce a high diversity of secondary metabolites with different biological activities, which are commonly evaluated when prospecting for bioherbicides. We analyzed the phytotoxic activity of organic extracts from the leaves of five medicinal species, *Byrsonima intermedia*, *Moquiniastrum polymorphum*, *Luehea candicans*, *Miconia chamissois*, and *Qualea cordata*. Phytotoxicity was evaluated on the initial growth of cucumber seedlings through tests with different concentrations of hexane, ethyl acetate, and methanol extracts. The results showed that all organic extracts and all concentrations affected cucumber development, with methanol extracts generally showing the greatest negative effect on the initial growth of the target species. The only exception was for *M. chamissois* extracts, in which the hexane extract had the greatest phytotoxicity. Furthermore, the organic extracts were subjected to preliminary phytochemical analysis, revealing the widespread presence of alkaloids along with other chemical classes. All the study species are thus potential candidates for use as natural herbicides.

Keywords: Cerrado, cucumber initial growth, leaf extract, phytochemical screening.

1.2 Introduction

The Cerrado is the second-largest Brazilian biome, the largest savanna in South America, and home to many medicinal plants. Among these, *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae), locally known as “murici,” has antiseptic, anti-hemorrhagic, antimicrobial, anti-diarrheal, anti-inflammatory, healing, and antimutagenic properties (Michelin et al., 2008; Guilhon-Simplicio and Pereira, 2011; Moreira et al., 2011), while *Moquiniastrum polymorphum* (Less.) G. Sancho (Asteraceae), popularly known as “cambará,” has antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, and anticancer properties (Gonçalves et al., 2019). The chemical composition and the pharmacological and toxicological activities of *M. polymorphum* have been studied for the development of new medicinal drugs and insecticides (Rojas de Arias et al., 1995; Simões et al., 1999; Moreira et al., 2000; Gonçalves et al., 2019). Another medicinal species from the Cerrado is *Luehea candicans* Mart. (Tiliaceae), popularly known as “açoita-cavalo,” which has potent antiproliferative activity in human kidney cancer cells (Silva et al., 2012). *Miconia chamissois* Naud. (Melastomataceae), commonly known as “folha-de-bolo,” is considered a natural source of bioactive molecules for the development of new anticancer drugs (Silva et al., 2020; Rosa et al., 2021), while *Qualea cordata* Spreng. (Vochysiaceae), known as “carvãozinho”, has antioxidant properties (Carnevale Neto et al., 2013) as well as antimicrobial, antiulcer, anticonvulsant, and analgesic activity (Carli et al., 2013).

Thanks to their production of a high variety of secondary metabolites (Qasem, 2002), medicinal plants are frequently also used as natural herbicides (Teerarak et al., 2010; Petrova et al., 2015; Algandaby and El-Darier, 2018). Weeds have a major impact on agriculture and are a leading cause of drops in food quality and agricultural productivity (Reddy et al., 2019). As cases of herbicide resistance increase worldwide, there is an increasing demand for new substances that are effective and inexpensive with a low environmental impact. Natural phytotoxins often act on unexplored molecular targets (Duke et al., 2000; Reigosa et al., 2013) or unlike synthetic ones (Dayan et al., 2009). The phytotoxicity of aqueous extracts from the five Cerrado species mentioned earlier – *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans*, *M. chamissois*, and *Q. cordata* – have been established in the literature (Pinto and Kolb, 2016). However, as the solvent polarity partially controls the solubility of chemical compounds, meaning that solvents directly influence the effectiveness of metabolite extraction, with organic solvents often more effective than aqueous ones (Cecchin et al., 2017), studies conducted with these solvents become important for a better understanding of the phytotoxicity of the species.

Therefore, this study aims to evaluate the phytotoxic effects of different organic extracts to characterize their composition and level of phytotoxicity and analyze the effects of different concentrations and solvents with varying levels of polarity on the early growth of cucumber seedlings.

1.3 Materials and Methods

1.3.1 Botanical material and extraction method

Healthy and completely expanded leaves of *Byrsonima intermedia*, *Moquiniastrum polymorphum*, *Luehea candicans*, *Miconia chamissois*, and *Qualea cordata* were collected from at least five randomly chosen individuals in the rainy season in the Ecological Station of Assis, municipality of Assis, São Paulo, Brazil (22°33'20" to 22°37'41"S and 50°24'48" to 50°21'27"W). The species were identified by Dr. Renata Giassi Udulutsch. Voucher specimens of *B. intermedia* (HASSI 2586), *M. polymorphum* (HASSI 2587), *L. candicans* (HASSI 2588), *M. chamissois* (HASSI 2589), and *Q. cordata* (HASSI 2590) were deposited at Herbarium Assisense (HASSI), Laboratory of Plant Systematics, Biological Sciences, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Assis, SP, Brazil, and registered in SisGen within registration number AFD1429. Afterward, leaves were dried in the shade, ground in a Wiley mill, and submitted to maceration in the dark, with mechanical agitation in hexane for two hours at 24 °C in a ratio of 1:10 w/v (dried leaves: hexane). The procedure was repeated two more times with the same plant material. After complete maceration, the extract was vacuum filtered through 14 µm porosity qualitative filter paper (Qualy), and the solvent evaporated to obtain the hexane extract. The plant residue was then extracted three times with ethyl acetate using the same procedure. The plant residue resulting from these extractions was extracted three times with methanol. The organic extracts were solubilized in their respective solvents to obtain concentrations of 1.25, 2.5, 3.17, and 5.00 mg mL⁻¹ for the phytotoxicity bioassays.

1.3.2 Physicochemical attributes of extracts

To eliminate possible interference during the bioassays, the physicochemical attributes of the crude organic extracts were determined: pH (with a pH meter, Tecnal, model TEC-2) and osmotic potential (using an Abbe refractometer with PEG 6000 solutions with different osmotic

potentials). They were calculated with the following equation: refractive index in Brix = $-3.7765x^2 - 10.237x + 0.195$ (Villela et al., 1991).

1.3.3 Bioassays with organic extracts in *Cucumis sativus* L.

A total of 10 mL of each organic extract in hexane, ethyl acetate, and methanol at concentrations of 1.25, 2.5, 3.17, and 5.00 mg mL⁻¹ were added to Petri dishes (100 mm diameter) containing two sheets of filter paper. The solvent was evaporated for 24 h at room temperature and protected from light, and then 10 mL of distilled water and 20 previously germinated cucumber seeds (2 mm of root protrusion) were added (three dishes, n = 60). Cucumber was used as a model seedling since it is highly sensitive to phytotoxicity bioassays (Rice, 1979; Ferreira and Aquila, 2000). Distilled water was used as a negative control. The Petri dishes were incubated in a germination chamber (model 102 FC; Eletrolab) at 25 ± 1 °C with a photoperiod of 12 h for 120 h. The length of the seedlings' main root and shoot were then measured. The growth parameters were calculated as the mean percentage difference compared to the negative controls (Chung et al., 2001) using the following Formula 1:

$$\text{Percentage difference (\%)} = \frac{\text{negative control} - \text{organic extract}}{\text{negative control}} \times 100 \quad (1)$$

Positive values represent stimulation, while negative values represent inhibition relative to the control.

1.3.4 Preliminary phytochemical analysis

A qualitative phytochemical analysis was performed on the hexane, ethyl acetate, and crude methanol extracts to determine the main chemical classes of the secondary metabolites (alkaloids, anthraquinones, coumarins, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, and tannins) following Matos (1997).

1.3.5 Statistical analysis

The experimental design was completely randomized. The normality of the residuals (Shapiro-Wilk test, $p > 0.05$) and the homogeneity of variances (Cochran test, $p > 0.05$) of the

data were tested. A one-way ANOVA followed by Dunnett's test ($p < 0.05$) was used to determine significant differences between the organic and control extracts, and a factorial ANOVA followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$) was performed to assess the interaction between the effects of organic extracts and concentrations. All statistical analyses were performed on absolute values.

1.4 Results

1.4.1 Physicochemical attributes of extracts

The pH values of the organic leaf extracts (hexane, ethyl acetate, and methanol) ranged from 3.90 to 6.35, while the potential osmotic values of the extracts ranged from -0.0005 to 0.0019 MPa. These values are within the ideal limits described in the literature (Eberlein, 1987; Pinto and Kolb, 2016), meaning that these factors did not affect the extracts' phytotoxicity.

1.4.2 Organic extract bioassays on cucumber seedlings

The statistical analyses showed significant differences in cucumber growth parameters across organic leaf extracts and concentration levels, as well as with respect to the interaction between the two. However, there was no significant interaction between extract and concentration for cucumber shoot length with *Q. cordata* extracts. For this species, there were differences across organic extracts, with the methanol extract being the only one to cause inhibition, and across concentration levels, with the lowest concentration of extract causing the greatest inhibition (data not shown).

All organic extracts and concentrations of *B. intermedia* significantly inhibited main cucumber root length except for hexane extracts at 1.25 and 2.50 mg mL⁻¹, which stimulated root growth, and ethyl acetate extract at 1.25 mg mL⁻¹, which did not affect root growth compared to the control (Table 1). The greatest inhibition of cucumber main root length was observed in the presence of methanol extracts at a concentration of 2.50 mg mL⁻¹. The organic extracts had no significant effect on cucumber shoot length, except for the ethyl acetate extract at 2.50 mg mL⁻¹, which led to a 13% increase compared to the control (Table 1).

All organic extracts of *M. polymorphum* significantly inhibited cucumber main root length at all concentrations, except for hexane extracts at 1.25 and 2.50 mg mL⁻¹, which had no effect relative to the control (Table 1). The greatest inhibition of main root length was observed

in the presence of the methanol extract at a concentration of 5.00 mg mL⁻¹. The organic extracts had no significant effect on cucumber shoot length, except for the ethyl acetate extract at 5.00 mg mL⁻¹ (Table 1).

Table 1. Effect of concentration of organic extracts from leaves of medicinal species of Cerrado on the growth of cucumber seedlings. Data of extracts are presented as the mean percentage difference compared with the negative control (=100%) $\pm$ standard deviation. Absolute values for the negative control (distilled water) were presented in cm units' $\pm$ standard deviation.

Species	Extract	Concentration (mg mL ⁻¹)	Main root length (%)	Shoot length (%)
<i>Byrsonima intermedia</i>	Hexane	1.25	14.1 $\pm$ 12.4 (*f)	-3.9 $\pm$ 14.5 (ab)
		2.50	9.6 $\pm$ 16.3 (*f)	6.9 $\pm$ 22.2 (abc)
		3.75	-7.8 $\pm$ 11.4 (de)	1.4 $\pm$ 14.3 (abc)
		5.00	-21.1 $\pm$ 13.2 (*ac)	1.4 $\pm$ 14.6 (abc)
	Ethyl Acetate	1.25	0.4 $\pm$ 11.1 (e)	6.1 $\pm$ 16.7 (abc)
		2.50	-13.4 $\pm$ 14.7 (*cd)	13.0 $\pm$ 22.2 (c)
		3.75	-20.5 $\pm$ 16.2 (*ac)	-6.5 $\pm$ 25.8 (a)
		5.00	-24.1 $\pm$ 14.5 (*a)	1.0 $\pm$ 26.6 (abc)
	Methanol	1.25	-23.9 $\pm$ 13.1 (*a)	9.2 $\pm$ 19.9 (bc)
		2.50	-61.5 $\pm$ 10.6 (*b)	-3.1 $\pm$ 28.6 (ab)
		3.75	-58.6 $\pm$ 15.4 (*b)	5.6 $\pm$ 24.1 (abc)
		5.00	-67.3 $\pm$ 9.9 (*b)	3.6 $\pm$ 17.3 (abc)
	Negative Control	-	8.47 $\pm$ 1.16 cm	2.25 $\pm$ 0.34 cm
<i>Moquiniastrum polymorphum</i>	Hexane	1.25	6.4 $\pm$ 15.4 (f)	11.3 $\pm$ 21.4 (c)
		2.50	-2.6 $\pm$ 15.0 (f)	9.6 $\pm$ 26.5 (c)
		3.75	-14.9 $\pm$ 19.5 (*e)	1.4 $\pm$ 26.3 (bc)
		5.00	-18.4 $\pm$ 18.4 (*ce)	4.8 $\pm$ 29.2 (bc)
	Ethyl Acetate	1.25	-13.8 $\pm$ 16.5 (*e)	-10.3 $\pm$ 29.6 (ab)
		2.50	-14.1 $\pm$ 13.4 (*e)	-10.6 $\pm$ 22.8 (ab)
		3.75	-26.9 $\pm$ 11.2 (*cd)	-8.0 $\pm$ 27.8 (b)
		5.00	-34.6 $\pm$ 12.8 (*bd)	-25.6 $\pm$ 26.7 (*a)
	Methanol	1.25	-20.1 $\pm$ 12.8 (*ce)	-0.7 $\pm$ 24.8 (bc)
		2.50	-37.3 $\pm$ 11.4 (*b)	12.8 $\pm$ 29.0 (c)
		3.75	-39.0 $\pm$ 12.8 (*b)	10.9 $\pm$ 27.8 (c)
		5.00	-49.1 $\pm$ 10.5 (*a)	16.3 $\pm$ 20.5 (c)
	Negative Control	-	7.82 $\pm$ 1.73 cm	2.08 $\pm$ 0.56 cm
<i>Luehea candicans</i>	Hexane	1.25	0.0 $\pm$ 12.1 (d)	6.9 $\pm$ 21.3 (cde)
		2.50	-1.7 $\pm$ 12.8 (d)	11.0 $\pm$ 15.4 (de)
		3.75	-0.6 $\pm$ 11.8 (d)	3.0 $\pm$ 11.5 (cdf)
		5.00	-1.9 $\pm$ 11.1 (d)	16.2 $\pm$ 18.2 (*e)
	Ethyl Acetate	1.25	-20.8 $\pm$ 13.2 (*c)	-13.2 $\pm$ 21.4 (*a)
		2.50	-24.2 $\pm$ 12.0 (*bc)	1.8 $\pm$ 17.9 (bcd)
		3.75	-27.1 $\pm$ 12.7 (*bc)	-4.9 $\pm$ 21.7 (abf)
		5.00	-30.3 $\pm$ 13.2 (*b)	-9.6 $\pm$ 21.3 (ab)

Species	Extract	Concentration (mg mL ⁻¹)	Main root length (%)	Shoot length (%)
<i>Miconia chamissois</i>	Methanol	1.25	-25.7 ± 15.6 (*bc)	4.8 ± 17.8 (cdef)
		2.50	-29.9 ± 14.4 (*b)	-2.0 ± 18.5 (abc)
		3.75	-43.0 ± 11.3 (*a)	1.0 ± 14.6 (bcd)
		5.00	-44.3 ± 13.0 (*a)	5.3 ± 17.1 (cdef)
	Negative Control	-	9.15 ± 0.92 cm	2.61 ± 0.32 cm
	Hexane	1.25	-9.1 ± 14.9 (fg)	-2.2 ± 25.4 (cd)
		2.50	-14.8 ± 14.4 (*efg)	-7.3 ± 21.1 (bcd)
		3.75	-39.2 ± 19.2 (*b)	-27.4 ± 19.0 (*a)
		5.00	-55.5 ± 28.5 (*a)	-25.2 ± 34.7 (*a)
	Ethyl Acetate	1.25	-8.5 ± 12.9 (fg)	6.5 ± 20.1 (d)
		2.50	-6.2 ± 12.6 (g)	6.1 ± 20.3 (d)
		3.75	-5.8 ± 12.1 (g)	6.1 ± 22.7 (d)
		5.00	-16.9 ± 11.7 (*ef)	-7.1 ± 35.9 (bcd)
<i>Qualea cordata</i>	Methanol	1.25	-20.1 ± 9.0 (*de)	6.1 ± 22.0 (d)
		2.50	-28.0 ± 10.9 (*cd)	0.7 ± 25.6 (cd)
		3.75	-33.3 ± 16.2 (*bc)	-15.1 ± 23.2 (abc)
		5.00	-29.6 ± 13.0 (*bcd)	-20.9 ± 23.4 (*ab)
	Negative Control	-	9.52 ± 1.69 cm	2.21 ± 0.47 cm
	Hexane	1.25	14.7 ± 13.2 (*i)	-4.6 ± 17.7 (-)
		2.50	10.4 ± 10.6 (hi)	7.9 ± 17.9 (-)
		3.75	0.2 ± 13.7 (gh)	5.6 ± 14.5 (-)
		5.00	-7.9 ± 12.7 (fg)	12.7 ± 17.3 (*-)
	Ethyl Acetate	1.25	-8.1 ± 17.7 (fg)	-0.7 ± 16.8 (-)
		2.50	-11.3 ± 17.3 (*ef)	2.2 ± 21.8 (-)
		3.75	-27.6 ± 24.5 (*cd)	2.3 ± 20.1 (-)
		5.00	-35.1 ± 25.3 (*c)	4.8 ± 21.1 (-)
	Methanol	1.25	-21.4 ± 9.3 (*de)	-19.0 ± 17.5 (*-)
		2.50	-35.6 ± 12.5 (*c)	-6.4 ± 17.0 (-)
		3.75	-48.5 ± 15.3 (*b)	-9.2 ± 15.8 (-)
		5.00	-63.3 ± 11.9 (*a)	-1.8 ± 22.3 (-)
	Negative Control	-	8.86 ± 1.09 cm	2.51 ± 0.39 cm

Note: *Significant difference between the negative control and the treated according to ANOVA and Dunnett's test. Significant differences among treatments are indicated by different letters according to factorial ANOVA and Tukey's test for the interaction among extracts and concentrations ($p \leq 0.05$). (-) No interaction among extracts and concentrations. All statistical tests were performed on absolute values.

The methanol and ethyl acetate extracts of *L. candicans* significantly inhibited the cucumber main root length at all concentrations compared to the control (Table 1). The greatest inhibition of main root length was observed in the presence of methanolic extracts at concentrations of 3.75 and 5.00 mg mL⁻¹. The hexane extracts did not affect root development compared to the control (Table 1). Organic extracts had no significant effect on cucumber shoot

length, except for the hexane extract at 5.00 mg mL⁻¹, which stimulated shoot growth, and the ethyl acetate extract at 1.25 mg mL⁻¹, which inhibited shoot growth compared to the control (Table 1).

The hexane and methanol extracts of *M. chamissois* significantly inhibited cucumber main root length at all concentrations, except for hexane extract at 1.25 mg mL⁻¹, which did not affect root growth compared to the control (Table 1). The ethyl acetate extracts had no significant effect on the length of the main root of the target species, except at a concentration of 5.00 mg mL⁻¹ (Table 1). The greatest inhibition of cucumber main root length was observed in the presence of the hexane extract at 5.00 mg mL⁻¹. The organic extracts had no significant effect on cucumber shoot length, except for the hexane extracts at 3.75 and 5.00 mg mL⁻¹ and the methanol extract at 5.00 mg mL⁻¹, which inhibited shoot growth in comparison to the control (Table 1).

The ethyl acetate and methanol extracts of *Q. cordata* significantly inhibited cucumber main root length at all concentrations, except for the ethyl acetate extract at 1.25 mg mL⁻¹, which was not different from the control. The hexane extracts had no significant effect on the main root length, except for a concentration of 1.25 mg mL⁻¹ (Table 1). The greatest inhibition of main root length was observed in the presence of the methanol extract at 5.00 mg mL⁻¹. Organic extracts had no significant effect on shoot length, except for the hexane extract at 5.00 mg mL⁻¹, which boosted shoot growth, and the methanolic extract at 1.25 mg mL⁻¹, which reduced shoot length compared to the control (Table 1).

1.4.3 Preliminary phytochemical analysis

Phytochemical screening was performed on the organic extracts of the five Cerrado species studied for eight classes of secondary metabolites (Table 2), of which only alkaloids were detected in the hexane extract of *M. chamissois*. Meanwhile, the methanolic extracts of at least one Cerrado species were positive for alkaloids, anthraquinones, coumarins, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, and tannins.

Only the methanol extract of *L. candicans* tested positive for coumarins, while flavonoids were detected in the methanol extracts of *M. polymorphum* and *L. candicans* (Table 2). Meanwhile, triterpenoids, saponins, and tannins were found in the methanol extracts of *B. intermedia*, *L. candicans*, and *Q. cordata* (Table 2). The methanol extracts of *B. intermedia*, *M. chamissois* and *Q. cordata* showed positive results for alkaloids and anthraquinones. In

addition, the presence of steroids was confirmed in the methanolic extract of *M. polymorphum* (Table 2).

Table 2. Preliminary phytochemical analysis of leaf extracts of medicinal plants of Cerrado.

Extract	Chemical test							
	As	AQs	CMs	STs	TRPs	FLVs	SPs	Ts
<i>B. intermedia</i>								
Hexane	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	+	+	-	-	+	-	++	++
Methanol	+	+	-	-	+++	-	+++	++
<i>M. polymorphum</i>								
Hexane	+++	-	-	-	-	-	+	-
Ethyl acetate	++	-	-	-	-	-	++	-
Methanol	-	-	-	++	-	+	-	-
<i>L. candicans</i>								
Hexane	+++	-	-	-	-	-	+	-
Ethyl acetate	+	-	-	++	-	-	-	-
Methanol	-	-	+	-	+++	+	++	+
<i>M. chamissois</i>								
Hexane	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	++	+	-	-	+	-	-	-
Methanol	++	+++	-	++	-	-	-	++
<i>Q. cordata</i>								
Hexane	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	+++	+++	-	++	-	-	-	++
Methanol	+++	+++	-	-	+	-	+	++

Note: (-): Negative test; (+): Weak positive test; (++): Positive test and (+++): Test strongly positive. The terms used were: As: Alkaloids (R. Dragendorff); AQs: Anthraquinones; CMs: Coumarins; STs: Steroids; TRPs: Triterpenoids; FLVs: Flavonoids; SPs: Saponins; Ts: Tannins.

1.5 Discussion

We extracted secondary metabolites in a series of solvents with increasing polarity to determine the effects of organic extracts of five representative medicinal species from the Cerrado. The data show that the methanolic extracts of *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans*, *Q. cordata*, and the hexane extract of *M. chamissois* were the most phytotoxic on the initial growth of cucumber seedlings. The effects of organic extracts on root development were more pronounced than on shoot growth. Root growth is generally suggested as a better indicator of the phytotoxicity of plant extracts. This trend of greater sensitivity in the roots has been widely reported in the literature (Chon et al., 2000; Habermann et al., 2016; Anwar et al.,

2020; Lima et al., 2021). This is likely because the roots are in direct contact with the extracts and are therefore exposed to higher doses of chemical compounds (Tanveer et al., 2012; Alves et al., 2022).

Differences in the effectiveness of plant extracts may be related to the fact that specific compounds are extracted in greater amounts based on their affinity with different solvents (Luthria and Mukhopadhyay, 2006; Corrêa et al., 2008). Thus, the effectiveness of extracting chemical compounds from plant materials and the phytotoxicity of extracts depends on the different solvents used for extraction (Luthria et al., 2007; Ladhari et al., 2020). In the present study, we observed that the phytotoxic effects of organic extracts that had already undergone the extraction process in less-polar organic solvents were more effective than those only extracted in less-polar solvents. For example, the methanolic extracts of *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans*, and *Q. cordata* showed higher phytotoxicity than the hexane and ethyl acetate extracts. Removing non-active chemical compounds may increase the concentration of active chemical compounds in the final extract and accentuate its phytotoxicity (Athmouni et al., 2015). However, this pattern was not observed for *M. chamissois*, the hexane extract that showed higher phytotoxicity than more polar solvents. Therefore, our results show that phytotoxicity varies according to the solvent used and that using solvents with different polarities can result in different extraction yields of bioactive compounds and different phytotoxic effects (Athmouni et al., 2015).

The hexane extract of *M. chamissois* showed a strong positive result for alkaloids, while other classes of secondary metabolites were not detected, suggesting that these compounds are responsible for the phytotoxic effects observed. This chemical class was also detected in the hexane extract of the other study species; however, the literature provided support for alkaloids presence only for related taxa of *M. polymorphum* (Faustino et al., 2017). Nebo et al. (2014) evaluated the phytotoxicity of two alkaloids isolated from *Ruta graveolens* on the growth parameters of four target species. The authors observed that the alkaloids had a potent phytotoxic effect comparable with the effects of a commercial herbicide.

The methanolic extracts of *B. intermedia* and *Q. cordata* exhibited positive results for five chemical classes. Our findings are supported by previous reports, which described some of the same chemical classes in these species. Specifically, triterpenoids were described for several *Qualea* species (Carnevale Neto et al., 2011), and triterpenoids, saponins, and tannins for *B. intermedia* (Orlandi et al., 2011). Thus, the high phytotoxicity on cucumber root growth may be associated with the presence of these compounds. Matsumoto et al. (2010) tested the effects of *Annona glabra* extracts on some target species and attributed the deleterious effects on plant

growth to the action of triterpenes, tannins, and flavonoids. Also, several isolated saponins from different species have been shown to inhibit the growth of target plants (Hernández-Carlos et al., 2011; Scognamiglio et al., 2012). It has been proposed that saponins inhibit plant development by forming high-molecular-weight matrices around the radicle, which prevents water uptake by plants (Waller et al., 1999).

The methanolic extract of *M. polymorphum* tested positive for two chemical classes, one of which is flavonoids. This finding is consistent with a previous report of the presence of flavonoids in this species (Gonçalves et al., 2019; Moreira et al., 2000), confirming our result. Therefore, this chemical class may be related to the phytotoxic effects observed on cucumber growth. A study has shown the phytotoxic potential of flavonoids isolated from species of Rutaceae, which were toxic to *Lepidium sativum* (Nebo et al., 2014).

The constituents of the methanolic extract of *L. candicans* leaves included triterpenoids, and flavonoids, as suggested by Tanaka et al. (2005) for related taxon. These chemical compounds or changes in their concentrations may be related to the high phytotoxicity at the early growth stage of cucumber. In addition, our study suggested the presence of anthraquinones in extracts of *B. intermedia*, saponins in *M. polymorphum*, coumarins, flavonoids, saponins, and tannins in *L. candicans*, anthraquinones, triterpenoids, and tannins in *M. chamissois*, and anthraquinones, saponins, and tannins in *Q. cordata*, as well as steroids for most of the species evaluated. However, there is a lack of studies with unequivocal analytical methods for confirming these substances in these taxa.

The phytotoxicity of the chemical classes found in the present study has been widely reported in the literature. Alkaloids affect the ultrastructure of root apices by promoting organelle disorganization, the occurrence of lipid droplets, and increases in size and number of vacuoles (Liu and Lovett, 1993). This may be due to their ability to interact with lipids, causing disturbances in cell membranes, and negatively affecting root growth (Lebecque et al., 2018). Recently, some authors have shown that the root caps of primary and lateral roots form a cuticle in the early stages of development. This structure is present in the primordia of the lateral roots and, when defective, causes delayed emergence and root deformation (Berhin et al., 2019). Since the cuticle is formed by lipids, alkaloids may impair the integrity of this cuticle, causing a reduction in the number of lateral roots formed, as observed for some of the extracts studied here. Among the phenolic compounds, tannins are responsible for the formation of superoxide anions and hydroxyl radicals by donating electrons to molecular oxygen, which alters the permeability of the membrane and cellular components, such as DNA and proteins. Flavonoids have been reported to trigger the accumulation of reactive oxygen species, leading to the

calcium ion signaling cascade and the death of the root system (Martins et al., 2021). Additionally, these compounds can alter the transport of minerals in plants, besides altering the structure of chloroplasts and mitochondria.

The present study demonstrates the phytotoxicity of different concentrations of organic extracts from leaves of *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans*, *M. chamissois*, and *Q. cordata*. The phytotoxic effect was mainly characterized by the inhibition of root development. The extracts with the greatest phytotoxicity were the methanol extracts of *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans*, and *Q. cordata* and the hexane extract of *M. chamissois*. We also provide an opportunity to characterize and purify the chemical compounds responsible for the phytotoxic effects of the most active extracts. Identifying these chemical compounds can contribute to a better understanding of the phytotoxicity of the Cerrado species and provide opportunities for environmentally friendly weed management.

1.6 References

- ALGANDABY, M.M. and EL-DARIER, S.M., 2018. Management of the noxious weed; *Medicago polymorpha* L. via allelopathy of some medicinal plants from Taif region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 25, no. 7, pp. 1339-1347. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.013> . PMID:30505179.
- ALVES, T.A., SPADETO, M.S., VASCONCELOS, L.C., SOUZA, J.R.C.L., MENINI, L., FERREIRA, M.F.S. and PRAÇA-FONTES, M.M., 2022. Phytotoxicity and cytogenetic action mechanism of leaf extracts of *Psidium cattleianum* Sabine in plant bioassays. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, e260985. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.260985>. PMID:35674589.
- ANWAR, T., QURESHI, H., PARVEEN, N., BASHIR, R., QAISAR, U., MUNAZIR, M., YASMIN, S., BASIT, Z., MAHMOOD, R.T., NAYYAR, B.G., KHAN, S., KHAN, S.A., QURESHI, M.M. and WALI, M., 2020. Evaluation of bioherbicidal potential of *Carica papaya* leaves. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 80, no. 3, pp. 565-573. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.216359>.
- ATHMOUNI, K., BELGHITH, T., BELLASSOUAD, K., EL FEKI, A. and AYADI, H., 2015. Effect of solvent polarity on the content of biomolecules and antioxidant activity of *Thapsia garganica* (Apiacea). *Algerian Journal of Natural Products*, vol. 3, no. 3, pp. 194-208. <http://dx.doi.org/10.1025/ajnp.2015.3.3.194>.
- BERHIN, A., DE BELLIS, D., FRANKE, R.B., BUONO, R.A., NOWACK, M.K. and NAWRATH, C., 2019. The root cap cuticle: a cell wall structure for seedling establishment and lateral root formation. *Cell*, vol. 176, no. 6, pp. 1367-1378.e8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.005>. PMID:30773319.

CARLI, C.B.A., QUILLES, M.B. and CARLOS, I.Z., 2013. Natural products with activity against multidrug-resistant tumor cells. In: M.K. RAI and K.V. KON, eds. *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*. London: Academic Press, pp. 237-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00016-1>.

CARNEVALE NETO, F., PILON, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S. and CASTRO-GAMBOA, I., 2011. Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. *Phytochemistry Reviews*, vol. 10, no. 3, pp. 413-429. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-011-9213-5>.

CARNEVALE NETO, F., SIQUITELLI, C.D., PILON, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S. and CASTRO-GAMBOA, I., 2013. Dereplication of phenolic derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using liquid chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 24, no. 5, pp. 758-764. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130098>.

CECCHIN, K., FAVARETTO, A., SCHEFFER-BASSO, S.M., BERTOL, C.D. and CHINI, S.O., 2017. Allelopathy and allelochemicals of *Eragrostis plana* (Poaceae) and its relation with phenology and nitrogen fertilization. *Planta Daninha*, vol. 35, e017157907. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100028>.

CHON, S.U., COUTTS, J.H. and NELSON, C.J., 2000. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. *Agronomy Journal*, vol. 92, no. 4, pp. 715-720. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2000.924715x>.

CHUNG, I.M., AHN, J.K. and YUN, S.J., 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, vol. 20, no. 10, pp. 921-928. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00046-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00046-1).

CORRÊA, L.R., SOARES, G.L.G. and FETT-NETO, A.G., 2008. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. *South African Journal of Botany*, vol. 74, no. 4, pp. 583-590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2008.02.006>.

DAYAN, F.E., CANTRELL, C.L. and DUKE, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 12, pp. 4022-4034. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>.

DUKE, S.O., DAYAN, F.E., ROMAGNI, J.G. and RIMANDO, A.M., 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, vol. 40, no. 1, pp. 99-111. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3180.2000.00161.x>.

EBERLEIN, C.V., 1987. Germination of *Sorghum alnum* seeds and longevity in soil. *Weed Science*, vol. 35, no. 6, pp. 796-801. <https://doi.org/10.1017/S0043174500079364>.

FAUSTINO, M.V., SECA, A.M.L., SILVEIRA, P., SILVA, A.M.S. and PINTO, D.C.G.A., 2017. Gas chromatography–mass spectrometry profile of four *Calendula* L. taxa: a comparative analysis. *Industrial Crops and Products*, vol. 104, pp. 91-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.029>.

FERREIRA, A.G. and AQUILA, M.E.A., 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 12, pp. 175-204.

GONÇALVES, V.M., MOREIRA, A.S. and OLIVEIRA, P.D., 2019. Genus *Moquiniastrum* (Asteraceae): overview of chemical and bioactivity studies. *Current Bioactive Compounds*, vol. 15, no. 4, pp. 377-398. <http://dx.doi.org/10.2174/1573407214666180524094146>.

GUILHON-SIMPLICIO, F. and PEREIRA, M.M., 2011. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, vol. 34, no. 6, pp. 1032-1041. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000600021>.

HABERMANN, E., PONTES, F.C., PEREIRA, V.C., IMATOMI, M. and GUALTIERI, S.C.J., 2016. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 76, no. 2, pp. 531-538. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.24114>. PMID:26959947.

HERNÁNDEZ-CARLOS, B., GONZÁLEZ-COLOMA, A., OROZCO-VALENCIA, A.U., RAMÍREZ-MARES, M.V., ANDRÉS-YEVES, M.F. and JOSEPH-NATHAN, P., 2011. Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry*, vol. 72, no. 8, pp. 743-751. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.022>. PMID:21439597.

LADHARI, A., GAALICHE, B., ZARRELLI, A., GHANNEM, M. and MIMOUN, M.B., 2020. Allelopathic potential and phenolic allelochemicals discrepancies in *Ficus carica* L. cultivars. *South African Journal of Botany*, vol. 130, pp. 30-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.026>.

LEBECQUE, S., CROWET, J.M., LINS, L., DELORY, B.M., DU JARDIN, P., FAUCONNIER, M.L. and DELEU, M., 2018. Interaction between the barley allelochemical compounds gramine and hordenine and artificial lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 9784, pp. 9784. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28040-6>.

LIMA, L.M., PEDROZA, L.S., OSÓRIO, M.I.C., SOUZA, J.C. and NUNEZ, C.V., 2021. Phytotoxicity of plant extracts of *Vismia japurensis* cultivated in vivo and in vitro. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 82, pp. e235475. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.235475>. PMID:34105661.

LIU, D.L. and LOVETT, J.V., 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 19, no. 10, pp. 2231-2244. <https://doi.org/10.1007/BF00979660> PMID:24248572.

LUTHRIA, D.L. and MUKHOPADHYAY, S., 2006. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 41-47. <https://doi.org/10.1021/jf0522457>.

LUTHRIA, D.L., BISWAS, R. and NATARAJAN, S., 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, vol. 105, no. 1, pp. 325-333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.047>.

MARTINS, S.A., SANTOS, R.C., RAMOS, A.R., FIGUEIREDO, P.L.B., SILVA, C.R.C. and SILVA, J.K.R., 2021. Allelopathic potential and phytochemical screening of *Piper divaricatum* extracts on germination and growth of indicator plant (*Lactuca sativa*). *South African Journal of Botany*, vol. 138, pp. 495-499. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.014>.

MATOS, F.J.A., 1997. *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC.

MATSUMOTO, R.S., RIBEIRO, J.P.N., TAKAO, L.K. and LIMA, M.I.S., 2010. Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Acta Botanica Brasílica*, vol. 24, no. 3, pp. 631-635. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000300005>.

MICHELIN, D.C., SANNOMIYA, M., FIGUEIREDO, M.E., RINALDO, D., SANTOS, L.C., SOUZA-BRITO, A.R.M., VILEGAS, W. and SALGADO, H.R.N., 2008. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, pp. 690-695. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500009>.

MOREIRA, A.S., SPITZER, V., SCHAPOVAL, E.E. and SCHENKEL, E.P., 2000. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 8, pp. 638-640. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8%3c638::AID-PTR681%3e3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8%3c638::AID-PTR681%3e3.0.CO;2-Q).

MOREIRA, L.Q., VILELA, F.C., ORLANDI, L., DIAS, D.F., SANTOS, A.L.A., SILVA, M.A., PAIVA, R., ALVES-DA-SILVA, G. and GIUSTI-PAIVA, A., 2011. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 138, no. 2, pp. 610-615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.006>. PMID:22008877.

NEBO, L., VARELA, R.M., MOLINILLO, J.M.G., SAMPAIO, O.M., SEVERINO, V.G.P., CAZAL, C.M., FERNANDES, M.F.G., FERNANDES, J.B. and MACÍAS, F.A., 2014. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the *Rutaceae* and *Meliaceae* families. *Phytochemistry Letters*, vol. 8, pp. 444-447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.02.010>.

ORLANDI, L., VILELA, F.C., SANTA-CECÍLIA, F.V., DIAS, D.F., ALVES-DA-SILVA, G. and GIUSTI-PAIVA, A., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 3, pp. 1469-1476. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.032>.

PETROVA, S.T., VALCHEVA, E.G. and VELCHEVA, I.G., 2015. A case study of allelopathic effect on weeds in wheat. *Ecologia Balkanica*, vol. 7, no. 1, pp. 121-129.

PINTO, G.F.S. and KOLB, R.M., 2016. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savanna. *Botany*, vol. 94, no. 2, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0124>.

QASEM, J.R., 2002. Allelopathic effects of selected medicinal plants on *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium murale*. *Allelopathy Journal*, vol. 10, no. 2, pp. 105-122.

REDDY, M.V., UMAJYOTHI, K., REDDY, P.S.S. and SASIKALA, K., 2019. Effect of pre and post emergence herbicides on nutrient removal and uptake in onion Cv. N - 53. *International Journal of Chemical Studies*, vol. 7, no. 5, pp. 1809-1812.

REIGOSA, M., GOMES, A.S., FERREIRA, A.G. and BORGHETTI, F., 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 27, no. 4, pp. 629-646. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062013000400001>.

RICE, E.L., 1979. Allelopathy—an update. *Botanical Review*, vol. 45, no. 1, pp. 15-109. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02869951>.

ROJAS DE ARIAS, A., FERRO, E., INCHAUSTI, A., ASCURRA, M., ACOSTA, N., RODRIGUEZ, E. and FOURNET, A., 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 45, no. 1, pp. 35-41. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01193-4](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(94)01193-4). PMID:7739225.

ROSA, M.N., SILVA, L.R.V., LONGATO, G.B., EVANGELISTA, A.F., GOMES, I.N.F., ALVES, A.L.V., OLIVEIRA, B.G., PINTO, F.E., ROMÃO, W., REZENDE, A.R., ARAÚJO, A.A.C., OLIVEIRA, L.S.F.M., SOUZA, A.A.M., OLIVEIRA, S.C., RIBEIRO, R.I.M.A., SILVA, V.A.O. and REIS, R.M., 2021. Bioprospecting of natural compounds from Brazilian Cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, pp. 3383. <https://doi.org/10.3390/ijms22073383>. PMID:33806119.

SCOGNAMIGLIO, M., D'ABROSCA, B., FIUMANO, V., CHAMBERY, A., SEVERINO, V., TSAFANTAKIS, N., PACIFICO, S., ESPOSITO, A. and FIORENTINO, A., 2012. Oleanane saponins from *Bellis sylvestris* Cyr. and evaluation of their phytotoxicity on *Aegilops geniculata* Roth. *Phytochemistry*, vol. 84, pp. 125-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.006>. PMID:22959224.

SILVA, A.G., SILVA, V.A.O., OLIVEIRA, R.J.S., REZENDE, A.R., CHAGAS, R.C.R., PIMENTA, L.P.S., ROMÃO, W., SANTOS, H.B., THOMÉ, R.G., REIS, R.M. and RIBEIRO, R.I.M.A., 2020. Matteucinol, isolated from *Miconia chamissois*, induces apoptosis in human glioblastoma lines via the intrinsic pathway and inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Invest. Investigational New Drugs*, vol. 38, no. 4, pp. 1044-1055. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-019-00878-1>. PMID:31781904.

SILVA, D.A., ALVES, V.G., FRANCO, D.M.M., RIBEIRO, L.C., SOUZA, M.C., KATO, L., CARVALHO, J.E., KOHN, L.K., OLIVEIRA, C.M.A. and SILVA, C.C., 2012. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). *Natural Product Research*, vol. 26, no. 4, pp. 364-369. <http://dx.doi.org/10.1080/14786411003752102>. PMID:21432719.

SIMÕES, C.M., FALKENBERG, M., MENTZ, L.A., SCHENKEL, E.P., AMOROS, M. and GIRRE, L., 1999. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, vol. 6, no. 3, pp. 205-214. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80010-5](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80010-5). PMID:10439486.

TANAKA, J.C.A., SILVA, C.C., DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V., CARVALHO, J.E. and FOGLIO, M.A., 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, vol. 28, no. 5, pp. 834-837. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000500020>.

TANVEER, A., JABBAR, M.K., KAHLIQ, A., MATLOOB, A., ABBAS, R.N. and JAVAID, M.M., 2012. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides*

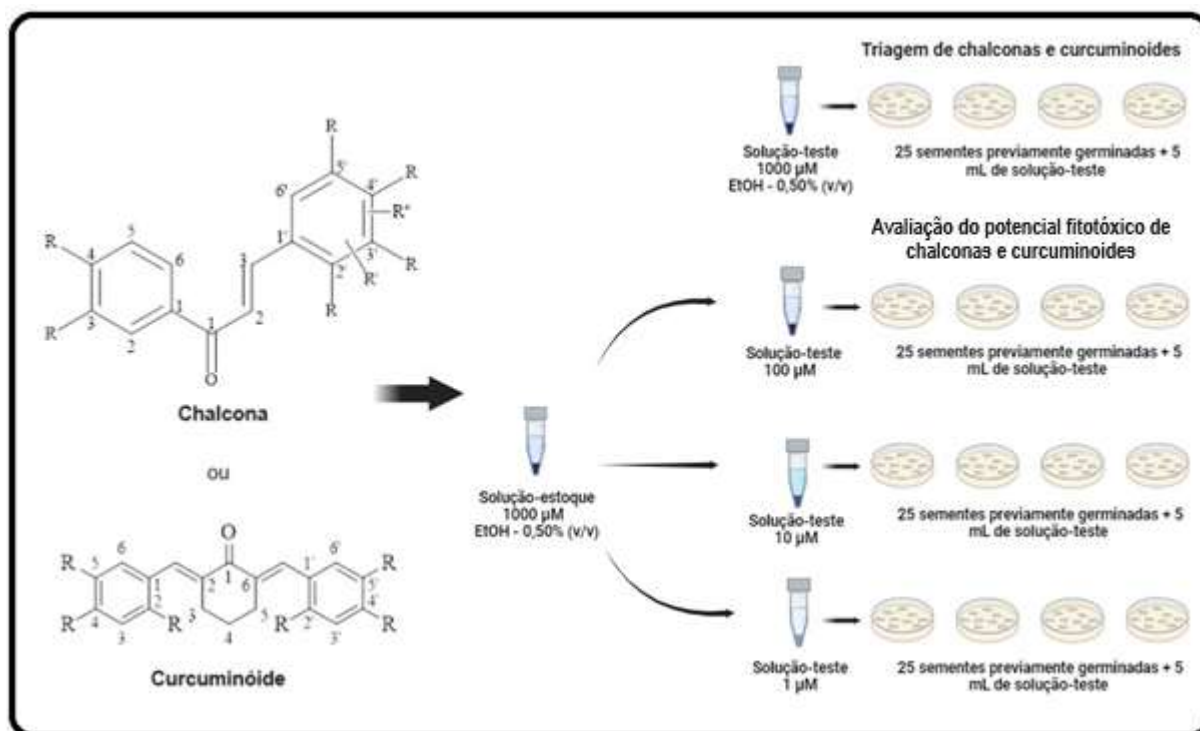
Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. *Chilean Journal of Agricultural Research*, vol. 72, no. 4, pp. 495-501. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000400006>.

TEERARAK, M., LAOSINWATTANA, C. and CHAROENYING, P., 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 14, pp. 5677-5684. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.038>. PMID:20199861.

VILLELA, F.A., DONI FILHO, L. and SEQUEIRA, E.L., 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 26, no. 11-12, pp. 1957-1968.

WALLER, G.R., YANG, C.F., CHEN, L.F., SU, C.H., LIOU, R.M., WU, S.C., YOUNG, C.C., LEE, M.R., LEE, J.S., CHENG, C.S., CHOU, C.H. and KIM, D., 1999. Saponins produced during the life cycle of mungbeans and their role as allelochemicals. *Studies in Plant Science*, vol. 6, pp. 105-130. [https://doi.org/10.1016/S0928-3420\(99\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0928-3420(99)80015-9).

CAPÍTULO 2

Atividade herbicida de chalconas e curcuminoides no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.

Resumo visual da seção Materiais e Métodos

Atividade herbicida de chalconas e curcuminoides no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.

1.1 Resumo

A avaliação do potencial fitotóxico de chalconas e curcuminoides representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento sustentável de herbicidas bioinspirados. Neste estudo, investigamos 25 derivados sintéticos de chalconas e 11 derivados sintéticos de curcuminoides, avaliando seu impacto no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. A substância 1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona foi a que apresentou o maior potencial fitotóxico, inibindo o crescimento inicial da espécie-alvo em 90% para a raiz principal e 89% para a parte aérea, na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, observou-se que a substância 3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, inibiu o crescimento inicial da raiz principal da espécie-alvo em 45%, na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto estimulou o crescimento inicial da raiz principal de *L. sativa* em mais de 60% nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ademais, a substância 1,3-difenil-2-propen-1-ona estimulou significativamente, em relação ao controle veículo, o crescimento inicial da raiz principal de *L. sativa* em todas as concentrações avaliadas. Pequenas alterações nas estruturas moleculares e variações na concentração de substâncias sintéticas podem desencadear respostas diversas, incluindo tanto a inibição quanto o estímulo do crescimento da espécie-alvo. Além disso, foi avaliada a conformidade dessas substâncias com a "regra dos cinco de Tice" para herbicidas, bem como a previsão *in silico* da permeabilidade intestinal e absorção cerebral em humanos. Concluiu-se que a maioria das substâncias estava em conformidade com os limites estabelecidos pela "regra dos cinco de Tice", sugerindo sua potencial aplicação como herbicida de baixo impacto ambiental. No entanto, as substâncias sintéticas exibiram elevada absorção intestinal e permeação cerebral.

Palavras-chave: herbicida, substâncias sintéticas, crescimento inicial de alface, QSAR.

1.2 Introdução

As plantas daninhas representam um desafio constante para a produtividade agrícola (Tilman et al., 2002; Pimente et al., 2005), exercendo impacto negativo alto no rendimento das culturas devido à intensa competição por recursos essenciais, como solo, água e nutrientes, resultando em perdas econômicas significativas (Charudattan, 2001; Rajcan e Swanton, 2001). Em resposta a essa ameaça, uma variedade de métodos de manejo têm sido empregados, abrangendo desde abordagens culturais e mecânicas até soluções químicas e biológicas. Entre essas estratégias, os herbicidas sintéticos emergiram como a abordagem mais eficaz, conquistando destaque notável nas últimas décadas, principalmente em países em desenvolvimento, devido à sua facilidade de aplicação e maior acessibilidade aos agricultores (Monaco et al., 2002).

Entretanto, o uso extensivo dessas substâncias não está isento de consequências. Os herbicidas sintéticos, conhecidos por sua persistência no ambiente e baixa biodegradabilidade, desempenham um papel significativo na poluição ambiental e representam uma ameaça à saúde humana. Além disso, a falta de seletividade desses herbicidas, aliada à rápida evolução da resistência das plantas daninhas, impõe sérios desafios à agricultura, resultando em danos substanciais às culturas e impactos adversos na produção (Bennett et al., 2004).

Diante desses desafios, emerge a necessidade de descobrir novos herbicidas com perfis toxicológicos e ambientais mais seguros, bem como mecanismos de ação (MoA) novos e eficazes. Uma estratégia particularmente promissora é a síntese de substâncias que incorporam o núcleo de substâncias naturais como modelo, culminando na criação de herbicidas “bioinspirados” ou “semelhantes” as substâncias naturais. Essas substâncias têm o potencial de exibir atividade biológica elevada, possuir alvos moleculares não explorados, adotar MoAs alternativos, demonstrar toxicidade mínima ou ausente e, crucialmente, apresentar maior biodegradabilidade em comparação com os herbicidas convencionais. Isso resulta em benefícios substanciais em termos de segurança ambiental e de saúde pública (Dayan e Duke, 2014).

As chalconas, metabólitos especializados de plantas, desempenham um papel crucial na defesa das plantas contra danos moleculares e fitopatógenos (Yayli et al., 2005), exibindo atividade antimicrobiana e propriedades protetoras contra insetos e herbívoros (Bitencourt et al., 2007; Liaras et al., 2011). Enquanto, a curcumina, um metabólito especializado dos rizomas da planta *Curcuma longa*, é conhecida por sua coloração amarela (Anand et al., 2012) e por apresentar diversas propriedades, como antibacteriana (Cuong et al., 2015), antiviral (Sordillo

e Helson, 2015), anti-inflamatória (Esatbeyoglu et al., 2015) e antioxidante (Zaidi e Mahboob, 2015). Substâncias naturais ou sintéticas que possuem um esqueleto carbônico semelhante à curcumina são denominadas curcuminoides (Anand et al., 2012). Tanto as chalconas quanto os curcuminoides têm despertado grande interesse devido à facilidade de realizar modificações moleculares em suas estruturas, o que as tornam candidatas promissoras na prospecção de novas substâncias herbicidas, além do fato de atuarem em uma variedade de atividades biológicas, como a antifúngica (Anand et al., 2012; Lee e Lee, 2014). As chalconas têm sido objeto de investigação em estudos voltados para a descoberta de novos herbicidas e reguladores de crescimento vegetal. Foi constatado que as chalconas inibem a germinação de sementes das plantas daninhas fedegoso (*Senna obtusifolia*) e dormideira (*Mimosa pudica*), sendo essa inibição intensificada por modificações químicas na estrutura da chalcona (Bittencourt et al., 2007). Recentemente, observou-se que a *trans*-chalcona suprime a germinação e o crescimento inicial de algumas ervas daninhas, com efeitos mínimos na germinação e crescimento inicial das culturas associadas (Díaz-Tielas et al., 2014); os autores destacam o papel da chalcona como reguladora do crescimento vegetal e seu potencial uso no manejo de plantas daninhas no campo. Adicionalmente, foi demonstrado que o óleo de diferentes espécies de *Curcuma* inibe a pré-emergência da germinação de sementes (16,3%), o crescimento da raiz (68,6%) e do hipocótilo (49,2%) de tomate (Rolli et al., 2014). Afeta extremamente a germinação e o crescimento de plântulas de *Cortaderia selloana*, uma planta daninha (Ibáñez e Blázquez, 2019), e também inibe a germinação e o crescimento de grama de trigo (Mahanta et al., 2022).

Neste estudo, investigou-se a atividade fitotóxica de 25 derivados sintéticos de 1,3-diaril-2-propen-1-ona (chalconas) e 11 derivados sintéticos de 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (curcuminoides), os quais apresentam diferentes substituintes, incluindo grupos doadores ou retiradores de elétrons. Para tanto, avaliamos o impacto dessas substâncias no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Este estudo busca contribuir para o avanço na descoberta de herbicidas inspirados em substâncias de origem natural, explorando novos caminhos para o manejo eficaz de plantas daninhas e a promoção da sustentabilidade na agricultura moderna.

1.3 Material e Métodos

1.3.1 Obtenção das substâncias sintéticas utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade

As substâncias sintéticas utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade, chalconas (**1-25**) (Fig. 1) e curcuminoides (**26-36**) (Fig. 2), foram fornecidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP. A nomenclatura das substâncias sintéticas é apresentada na Tabela 1.

1.3.2 Preparação das soluções das substâncias sintéticas utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade

No âmbito deste estudo, cada substância pertencente às chalconas (**1-25**) (Fig. 1) e curcuminoides (**26-36**) (Fig. 2) foi solubilizada individualmente em 0,50% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a solubilização, as suspensões foram agitadas vigorosamente e, em seguida, transferidas para balões volumétricos. O volume foi completado com água destilada para alcançar a concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$, configurando assim a solução-teste utilizada na triagem das substâncias sintéticas. Para as substâncias com maior fitotoxicidade, soluções de concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição da solução de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

1.3.3 Característica físico-química das soluções-teste

O pH das soluções-teste foi avaliado devido à possibilidade de as substâncias conterem grupos químicos que exercem influência sobre este parâmetro, o que pode, por si só, resultar em efeito fitotóxico (Souza Filho et al., 1996). Para isso, o pH das soluções foi determinado nas concentrações descritas anteriormente, com o auxílio do pHmêtro TEC-2 da Tecnal, Brasil.

1.3.4 Espécie-alvo

Foi utilizada como espécie-alvo a alface Simpson semente preta (marca ISLA) (*Lactuca sativa* L.) para avaliar o potencial fitotóxico das soluções. Essa espécie foi selecionada como bioindicadora de fitotoxicidade devido à sua rápida germinação e crescimento inicial, bem como ao seu grau de sensibilidade, o que permite a detecção de resultados em baixas concentrações de substâncias ativas (Ferreira e Aquila, 2000).

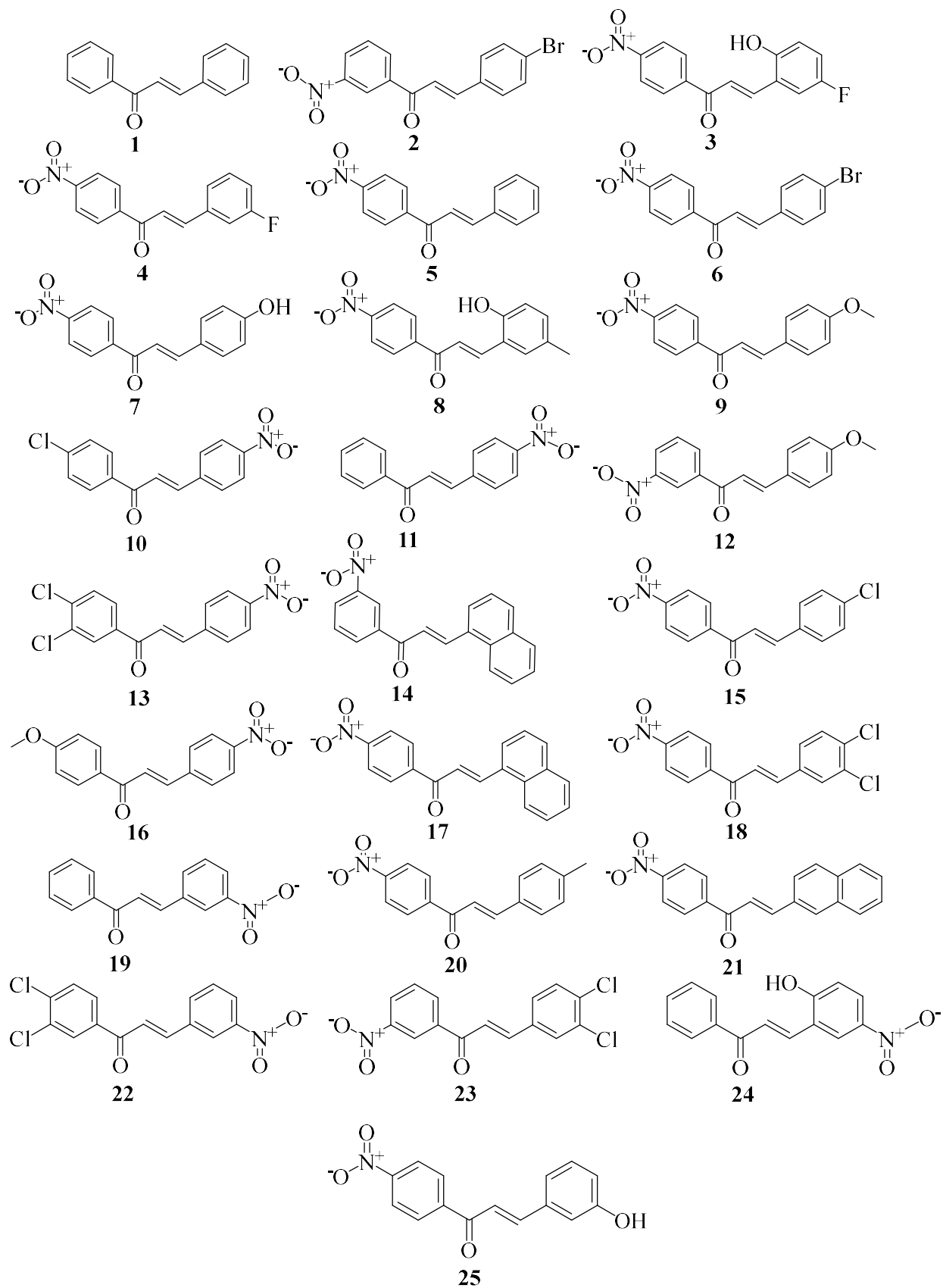
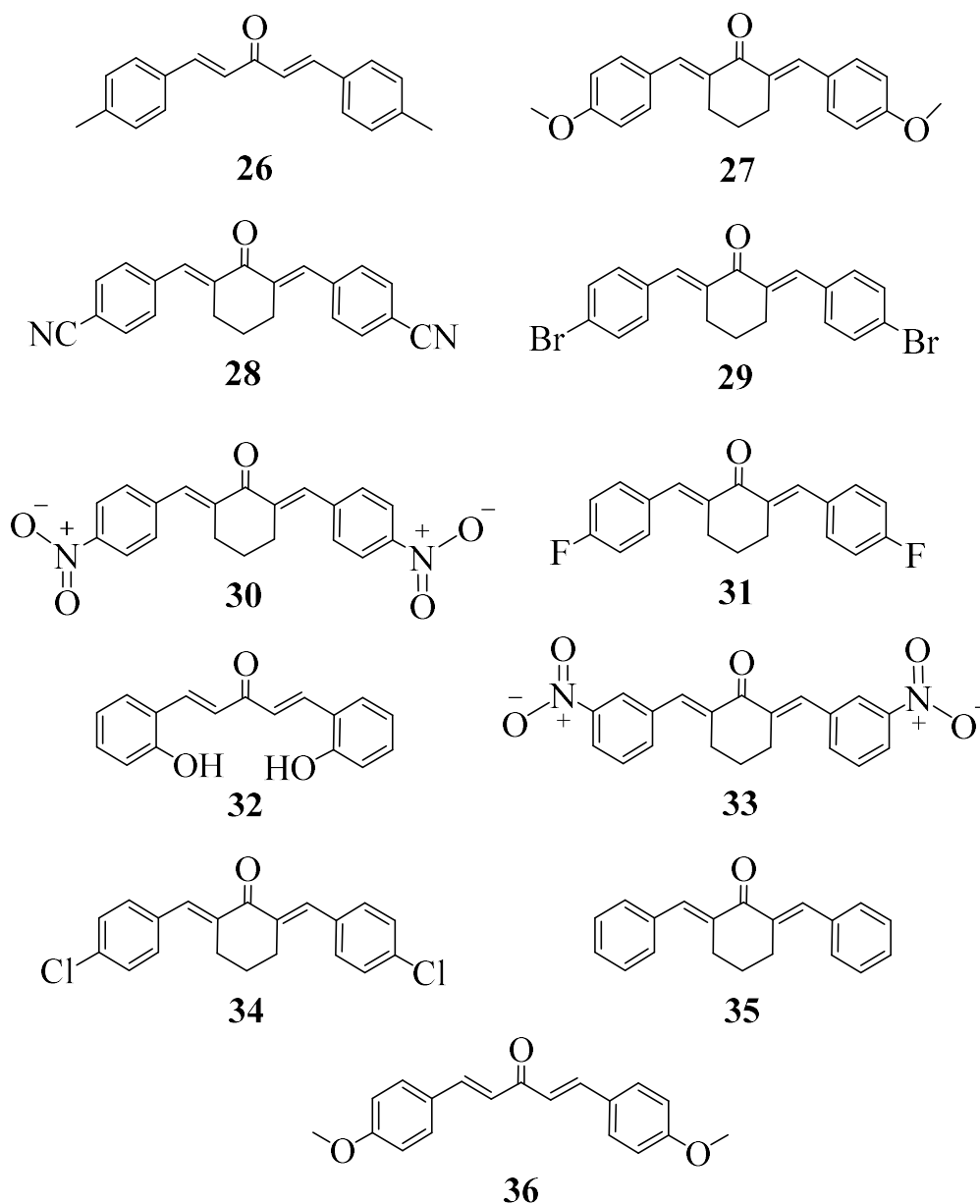
Figura 1. Estrutura molecular das chalconas analisadas (1-25).

Figura 2. Estrutura molecular dos curcuminoides analisados (26-36).



1.3.5 Fitotoxicidade de chalconas e curcuminoides em bioensaio de crescimento inicial

A triagem das substâncias para avaliação do potencial fitotóxico foi realizada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% (seguido de enxágue com água destilada) e etanol a 70%. As placas foram posteriormente secas à temperatura ambiente, sendo adicionada uma folha de papel filtro previamente autoclavada. Cada tratamento consistiu em quatro repetições, com 25 sementes de alface previamente germinadas (2 mm de protrusão radicular) por placa, totalizando 100 plântulas, e 5 mL de solução-teste na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As substâncias com maior atividade fitotóxica

foram avaliadas nas condições já descritas, nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Solução aquosa contendo DMSO (0,50% (v/v)), sem qualquer substância avaliada, serviu como controle veículo. Adicionalmente, duas substâncias com potencial bioestimulante também foram selecionadas a partir da triagem para avaliação nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As placas de Petri foram incubadas em germinador modelo 102 FC da Eletrolab a 25 °C $\pm$ 1, no escuro, durante 4 dias. Os parâmetros analisados incluíram o comprimento da raiz principal e da parte aérea. Antes das medições, as plântulas foram congeladas a -10°C para evitar o crescimento subsequente.

1.3.6 Biodisponibilidade em plantas e predição da absorção intestinal e cerebral *In Silico* (ADME) das substâncias sintéticas

Para predizer a absorção gastrointestinal (alta ou baixa) e a penetração cerebral (sim ou não) das substâncias sintéticas, utilizamos o preditor SwissADME (www.swissadme.ch/, acessado em 03 de janeiro de 2024). As previsões foram realizadas pelo método BOILED-Egg, uma abordagem gráfica descritiva baseada em duas regiões elipsoidais: uma para permeação intestinal (alta ou baixa) e outra para permeação cerebral (sim ou não). Esse método se fundamenta principalmente em dois parâmetros: (1) a lipofilicidade das substâncias, avaliada pelo coeficiente de partição (P) com um valor de LogP calculado conforme o método de Wildman-Crippen e (2) a polaridade, determinada por um valor calculado da área de superfície polar topológica (tPSA) (Daina e Zoete, 2016; Daina et al., 2017).

Os valores de lipofilicidade (LogP) e polaridade (tPSA) estão disponíveis nas Tabelas S1 e S2, juntamente com o número de átomos pesados, número de átomos pesados aromáticos, número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), peso molecular (PM), número de ligações com rotação livre (nRotB), fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), solubilidade (LogS) e a refratividade molar (Rm). Todos esses parâmetros físico-químicos foram obtidos por meio do preditor SwissADME.

1.3.7 Análise estatística

Os comprimentos da raiz principal e da parte aérea das plântulas foram calculados como diferença percentual em relação ao controle veículo, seguindo a metodologia proposta por Chung et al. (2001).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene, $p > 0,05$). Como essas premissas não foram atendidas, as médias de cada tratamento foram comparadas entre si e com o controle veículo, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$) (Zar, 2010). As análises estatísticas foram realizadas com valores absolutos.

1.4 Resultados e Discussão

1.4.1 Característica físico-química das soluções-teste

O valor de pH para o controle veículo foi registrado em 5,27, enquanto as soluções-teste variaram na faixa de pH de 4,69 a 5,45 (dados não apresentados individualmente). É relevante observar que essa faixa de pH está de acordo com as condições aceitáveis para o desenvolvimento inicial de espécies utilizadas como bioindicadoras de fitotoxicidade (Borella e Pastorini, 2010). Assim, os efeitos de regulação de crescimento observados neste estudo não se devem a valores impróprios de pH das substâncias avaliadas.

1.4.2 Triagem e avaliação de chalconas e curcuminoides como modulador de crescimento inicial

Entre as chalconas sintéticas analisadas, a chalcona **1** apresentou estímulo significativo no crescimento da raiz principal de alface quando comparada ao controle veículo na concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 1). Por outro lado, as chalconas portadoras de grupos clorofenil e nitrofenil (substâncias **10** e **13**) apresentaram significativa inibição no alongamento da raiz da espécie-alvo (Tabela 2), enquanto as substâncias com o grupo 4'-nitrofenil (chalcona **11**), e 3-nitrofenil e 4'-metoxifenil (chalcona **12**) também demonstraram inibição significativa no crescimento tanto da raiz principal quanto da parte aérea de alface em comparação com o controle veículo (Tabela 2). Enquanto, as chalconas sintéticas que continham substituintes retiradores de elétrons, incluindo bromo e cloro (substâncias **6** e **23**), e substituintes doadores de elétrons, como os grupos hidroxila e metoxila (substâncias **7** e **9**), não demonstraram efeito significativo no crescimento inicial de *L. sativa*.

Tabela 1. Efeito das soluções de chalconas (**1-9**) na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre crescimento inicial de alface.

Substância	Nomenclatura	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
1	1,3-difenil-2-propen-1-ona	79,3 $\pm$ 63,3 ac*	-14,6 $\pm$ 21,4 a
2	3-(4-bromofenil)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	39,4 $\pm$ 24,0 ab*	46,5 $\pm$ 45,9 b*
3	3-(5-fluoro-2-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	36,1 $\pm$ 53,5 ad*	28,5 $\pm$ 31,9 b*
4	3-(4-fluorofenil)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	33,7 $\pm$ 31,9 ad*	14,6 $\pm$ 33,2 ab*
5	1-(4-nitrofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	27,0 $\pm$ 50,1 ad*	17,4 $\pm$ 59,1 ab
6	3-(4-bromofenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	17,7 $\pm$ 48,3 bd	-5,6 $\pm$ 29,8 ac
7	3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona	8,5 $\pm$ 26,0 bd	-2,8 $\pm$ 29,2 b
8	3-(2-hidrox-5-metilfenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	2,1 $\pm$ 30,1 d	29,2 $\pm$ 48,1 bc*
9	3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	0,8 $\pm$ 18,8 c	0,6 $\pm$ 13,9 d
Controle veículo	Solução aquosa contendo DMSO (0,50% (v/v))	2,0 $\pm$ 0,7 cm	0,5 $\pm$ 0,2 cm

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcd, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo (= 100%) $\pm$ DP.

Em relação aos curcuminoides, a substância **26**, que contém um grupo doador fraco de elétrons (grupo metila) nas posições 4 e 4' dos anéis aromáticos, estimulou significativamente o crescimento da raiz principal e da parte aérea de *L. sativa* em comparação com o controle veículo (Tabela 3). Por outro lado, a substância **36**, que contém um grupo doador forte de elétrons (grupo metoxila) nas mesmas posições, demonstrou a maior inibição dos parâmetros de crescimento inicial da espécie-alvo (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito das soluções de chalconas (**10-25**) na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre crescimento inicial de alface.

Substância	Nomenclatura	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
10	1-(4-clorofenil)-3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-49,4 $\pm$ 13,8 cdef*	-17,0 $\pm$ 11,1 a*
11	3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	-45,2 $\pm$ 15,1 bcde*	-13,6 $\pm$ 10,8 a*
12	3-(4-metoxifenil)-1-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-45,0 $\pm$ 13,7 bcde*	-12,0 $\pm$ 11,5 a*
13	1-(3,4-diclorofenil)-3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-34,5 $\pm$ 31,7bcd*	-10,9 $\pm$ 13,4 a*
14	3-(naftalen-1-il)-1-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-32,3 $\pm$ 14,6 fg*	17,8 $\pm$ 39,6 b
15	3-(4-clorofenil)-1-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-32,0 $\pm$ 12,8 g*	14,6 $\pm$ 28,3 b*
16	1-(4-metoxifenil)-3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-25,6 $\pm$ 18,8 abc*	-11,7 $\pm$ 8,1 a*
17	3-(naftalen-1-il)-1-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-24,7 $\pm$ 16,4 efg*	-23,0 $\pm$ 15,6 b*
18	3-(3,4-diclorofenil)-1-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-24,6 $\pm$ 21,8 abc*	-11,4 $\pm$ 10,8 a*
19	3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	-16,7 $\pm$ 27,8 ab*	-15,1 $\pm$ 13,4 a*
20	1-(4-nitrofenil)-3-(<i>p</i> -tolil)prop-2-en-1-ona	-10,7 $\pm$ 17,2 a*	-5,1 $\pm$ 9,5 a
21	3-(naftalen-2-il)-1-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-9,7 $\pm$ 16,7 defg	-25,4 $\pm$ 13,4 b*
22	1-(3,4-diclorofenil)-3-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-6,4 $\pm$ 21,2 a	-7,2 $\pm$ 8,9 a*
23	3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-6,2 $\pm$ 18,8 a	-4,7 $\pm$ 10,7 a
24	1-(4-clorofenil)-3-(2-hidroxil-5-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	-2,8 $\pm$ 32,9 a	-10,3 $\pm$ 10,6 a*
25	3-(3- hidroxifenil)-1-(4- nitrofenil) prop-2-en-1-ona	-1,1 $\pm$ 27,6 def	-28,2 $\pm$ 22,3 b*
Controle veículo	Solução aquosa contendo DMSO (0,50% (v/v))	2,0 $\pm$ 0,7 cm	0,5 $\pm$ 0,2 cm

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcdefg, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo ($= 100\%$) $\pm$ DP.

Tabela 3. Efeito das soluções de curcuminoides (**26-36**) na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre crescimento inicial de alface.

Substância	Nomenclatura	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
26	1,5-di- <i>p</i> -tolilpenta-1,4-dien-3-ona	93,5 $\pm$ 31,1 a*	16,7 $\pm$ 34,9 a
27	2,6-bis(4-metoxibenzilideno)ciclohexan-1-ona	77,8 $\pm$ 29,7 ab*	12,2 $\pm$ 14,3 a*
28	4,4'-(2-oxaciclohexano-1,3-diilideno)bis(metanoililideno)di benzonitrila	76,1 $\pm$ 34,4 ab*	33,1 $\pm$ 18,8 a*
29	2,6-bis(4-bromobenzilideno)ciclohexan-1-ona	72,6 $\pm$ 39,3 abc*	27,1 $\pm$ 17,8 a*
30	2,6-bis(4-nitrobenzilideno)ciclohexan-1-ona	59,7 $\pm$ 33,6 abcd*	27,8 $\pm$ 15,8 a*
31	2,6-bis(4-fluorobenzilideno)ciclohexan-1-ona	19,6 $\pm$ 18,4 de*	-6,9 $\pm$ 17,9 b
32	1,5-bis(2-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona	-2,2 $\pm$ 87,2 cde	-54,0 $\pm$ 41,3 b*
33	2,6-bis(3-nitrobenzilideno)ciclohexan-1-ona	-4,0 $\pm$ 90,1 de	-43,9 $\pm$ 41,0 b*
34	2,6-bis(4-clorobenzilideno)ciclohexan-1-ona	-27,1 $\pm$ 12,1 ef*	2,1 $\pm$ 22,1 b
35	2,6-di(benzilideno)ciclohexan-1-ona	-34,9 $\pm$ 22,1 bcd*	-9,9 $\pm$ 8,4 a
36	1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona	-90,7 $\pm$ 0,0 f*	-89,2 $\pm$ 3,7 b*
Controle	Solução aquosa contendo DMSO (0,50% (v/v))	2,0 $\pm$ 0,7 cm	0,5 $\pm$ 0,2 cm

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcdef, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo ($= 100\%$) $\pm$ DP.

Durante a triagem, identificamos que as chalconas e curcuminoides que exibiram a maior capacidade de inibição no crescimento de plântulas de alface geralmente continham anéis nitrofenila, metoxifenila, clorofenila ou uma combinação desses grupos (substâncias **10**, **11**, **12**, **15** e **36**). Com base nessas observações e com o objetivo de investigar mais profundamente a relação entre as características estruturais dessas substâncias sintéticas com seu potencial fitotóxico, testamos as mesmas em três diferentes concentrações: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Adicionalmente, as substâncias **1** e **26** foram selecionadas devido à sua capacidade de estimular o crescimento da espécie-alvo.

Tabela 4. Efeito das soluções de chalconas e curcuminoides nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre crescimento inicial de plântulas de alface.

Concentração	Substância	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1	63,6 $\pm$ 53,9 b*	-16,6 $\pm$ 15,6 b*
	10	-9,6 $\pm$ 20,0 a	-14,8 $\pm$ 9,0 b*
	11	60,9 $\pm$ 38,8 b*	-7,7 $\pm$ 17,5 ab
	12	8,7 $\pm$ 32,8 a	-13,3 $\pm$ 10,4 ab*
	15	28,3 $\pm$ 44,9 a*	-4,9 $\pm$ 9,5 a
	26	-0,6 $\pm$ 24,3 a	-10,2 $\pm$ 13,3 ab*
	36	6,4 $\pm$ 37,0 a	-5,9 $\pm$ 10,7 a
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1	37,8 $\pm$ 36,1 c*	-8,7 $\pm$ 19,1 ac
	10	-4,1 $\pm$ 23,6 ab	-14,7 $\pm$ 14,3 a*
	11	4,7 $\pm$ 41,9 ab	-3,4 $\pm$ 12,9 bc
	12	-13,2 $\pm$ 19,0 b	-14,4 $\pm$ 11,4 a*
	15	11,5 $\pm$ 44,1 ab	-4,5 $\pm$ 13,1 bc
	26	7,7 $\pm$ 26,0 a	-8,2 $\pm$ 11,0 ab*
	36	-10,3 $\pm$ 39,2 ab	-15,7 $\pm$ 11,6 a*
1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1	74,5 $\pm$ 53,1 b*	-10,0 $\pm$ 17,4 ac
	10	-4,6 $\pm$ 23,8 a	-10,3 $\pm$ 12,7 ac*
	11	81,4 $\pm$ 34,9 b*	-8,3 $\pm$ 20,9 a
	12	-2,9 $\pm$ 25,1 a	-18,0 $\pm$ 11,8 bc*
	15	-4,3 $\pm$ 36,6 a	-7,7 $\pm$ 18,0 a
	26	-10,2 $\pm$ 39,1 a	-6,8 $\pm$ 8,6 a
	36	-7,6 $\pm$ 40,6 a	-14,5 $\pm$ 13,0 ac*
Controle	Solução aquosa contendo DMSO (0,50% (v/v))	2,2 $\pm$ 0,8 cm	0,7 $\pm$ 0,2 cm

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abc, indicam diferenças significativas entre os tratamentos de mesma concentração. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo (= 100%) $\pm$ DP.

Nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as substâncias testadas não inibiram significativamente o comprimento da raiz principal de alface (Tabela 4). No entanto, merecem destaque as substâncias **1** e **11** que estimularam significativamente o crescimento da raiz principal de alface em relação ao controle veículo, em ambas as concentrações (Tabela 4). Especificamente, na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se um estímulo significativo no comprimento da raiz principal de alface apenas para a substância sintética **1** (37,80%), em relação ao controle veículo (Tabela 4).

Dado que a maioria dos estudos tradicionalmente se concentram nos efeitos inibitórios de extratos e substâncias sintéticas no crescimento inicial das espécies-alvo (Reigosa et al., 2013), destaca-se a importância de identificar produtos capazes de promover um impacto positivo na germinação e/ou crescimento das plantas, como evidenciado por pesquisas anteriores (Santos et al., 2002, Cândido et al., 2010, Silva et al., 2011; Gomes et al., 2017). Essas descobertas abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de produtos voltados especificamente para o estímulo do crescimento de plantas.

Em relação à fitotoxicidade das chalconas e dos curcuminoides, é possível que os efeitos estereoeletrônicos de seus substituintes possam afetar o funcionamento do ciclo metabólico da planta, alterando a síntese de flavonoides na rota de biossíntese de fenilpropanoides e impactando o crescimento e desenvolvimento da planta (Gomes et al., 2017). A compreensão futura dessas interações específicas é crucial para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes e seletivas no controle de plantas daninhas ou na promoção do crescimento de culturas desejadas.

1.4.3 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição da absorção intestinal e cerebral *In Silico* (ADME) das substâncias sintéticas

No âmbito da biodisponibilidade de substâncias bioativas em sistemas biológicos, diversos fatores desempenham um papel fundamental, pois essas substâncias enfrentam múltiplas barreiras até alcançarem seus alvos específicos. Estes fatores incluem solubilidade, permeabilidade da membrana e processos de absorção e transporte ativo no organismo (Lipinski et al., 2001). No contexto de medicamentos orais para humanos, propriedades moleculares associadas tipicamente à sua eficácia foram resumidas na "regra dos cinco", a qual define critérios como $\text{LogP} \leq 5$; $\text{PM} \leq 500$; $\text{HDB} \leq 5$ e $\text{HBA} \leq 10$ (Lipinski et al., 2001). Além disso, critérios adicionais como $\text{PSA} \leq 140$ e $\text{nRotB} \leq 10$ foram posteriormente incorporados (Veber et al., 2002).

Para o estudo das propriedades físico-químicas de herbicidas, foi desenvolvida a "regra dos cinco de Tice", que revelou notável semelhança com a regra dos cinco para medicamentos ativos, incluindo critérios como $\text{LogP} \leq 5$; $\text{PM} 150\text{-}500$; $\text{PSA} 50\text{-}60$; $\text{HBD} \leq 3$; $\text{HBA} 2\text{-}12$; $\text{nRotB} \leq 12$ (Tice et al., 2001). Essa regra pode ser aplicada como uma ferramenta para a previsão da biodisponibilidade de pequenas moléculas em plantas (Avram et al., 2014).

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade mencionados anteriormente, foi conduzido um estudo computacional para prever os parâmetros físico-químicos das

substâncias sintéticas na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A análise computacional teve como objetivo avaliar se as substâncias atendem aos critérios estabelecidos na "regra dos cinco de Tice" para herbicidas (os valores desses parâmetros são apresentados nas Tabelas S1 e S2).

O coeficiente de partição n-octanol/água, conhecido como LogP, é uma medida da hidrofobicidade molecular amplamente utilizada em estudos de QSAR (Relações Quantitativas Estrutura-Atividade) e no planejamento racional de medicamentos. A hidrofobicidade desempenha um papel crucial na absorção de medicamentos, biodisponibilidade, interações medicamento-receptor de natureza hidrofóbica, metabolismo de moléculas e toxicidade (Teixeira et al., 2013). Além disso, o LogP tornou-se um parâmetro essencial no design de produtos químicos com impacto ambiental. É importante destacar que, com exceção dos curcuminoides (**29**, **31** e **34**), cujos valores de LogP foram de 6,2, 5,8 e 6,0, respectivamente, as demais substâncias não violaram os critérios estabelecidos por Tice em relação ao LogP. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação clara entre os valores de LogP e as atividades biológicas das substâncias sintéticas.

As substâncias sintéticas, tanto as chalconas quanto os curminoides, violaram os critérios estabelecidos por Tice em relação ao tPSA (área superficial polar topológica). No entanto, é importante notar que vários herbicidas comerciais também violam esse critério (Tice, 2001). Em relação ao HBA (número de aceptores de ligação de hidrogênio), as substâncias **1**, **26**, **29**, **34** e **35** apresentaram valores ligeiramente inferiores à faixa estabelecida por Tice (Tabelas S1 e S2). Com relação aos demais parâmetros físico-químicos, todas as substâncias estavam dentro dos limites propostos por Tice.

A contagem de átomos aceptores de ligações de hidrogênio (HBA) foi calculada considerando a soma de átomos de oxigênio e nitrogênio na estrutura de cada substância química, conforme proposto por Lipinski (2004). O número de átomos doadores de ligações de hidrogênio (HBD) corresponde à soma de átomos O-H e N-H. Entre os herbicidas atualmente em uso, 93% deles possuem dois ou menos átomos doadores de ligações de hidrogênio (Tice, 2001). As substâncias sintéticas avaliadas neste estudo não violaram os limites estabelecidos por Tice para o parâmetro HBD.

O número de ligações com livre rotação (nRotB) é um parâmetro que indica a flexibilidade molecular das substâncias. Nenhuma das substâncias sintéticas violou as regras de Tice em relação a esse parâmetro. No entanto, não foi observada uma correlação clara entre o número de ligações com livre rotação e a atividade biológica. As substâncias **9**, **12**, **16** e **36** se destacaram como as mais flexíveis entre as substâncias avaliadas, com valores de nRotB iguais a 5, 5, 5 e 6, respectivamente (Tabelas S1 e S2).

A previsão gráfica da absorção intestinal e permeação cerebral foi determinada utilizando o método BOILED-Egg baseado em tPSA/LogP, incluído na ferramenta SwissADME, e é indicada para cada substância sintética nas Tabelas S1 e S2. Para chalconas, a porcentagem de substâncias com alta permeabilidade intestinal prevista foi de 100% ($n = 25$) (Figura 3 e 4), enquanto para os curcuminoides, a porcentagem correspondente foi de 73% ($n = 8$) (Figura 5), conforme demonstrado pela sua localização dentro da elipse branca que define a absorção intestinal. Esses resultados destacam a variação na permeabilidade intestinal prevista entre as substâncias sintéticas analisadas, com a substância sintética **29** exibindo baixa permeabilidade intestinal prevista, enquanto as substâncias **27** e **28** apresentaram valor nulo para absorção intestinal prevista (Tabela S2). Nossos resultados indicam uma alta absorção das substâncias sintéticas (chalconas e curcuminoides) pelo trato gastrointestinal humano. Essa descoberta sugere a necessidade de considerar a possível exposição humana a essas substâncias sintéticas por via oral, que pode ocorrer comumente através da ingestão de alimentos ou água contaminados por herbicidas. Isso poderia potencialmente contribuir para a ingestão dessas substâncias, o que pode ter implicações para a saúde humana, incluindo possíveis efeitos adversos, como desregulação endócrina e potencial carcinogenicidade (Mostafalou e Abdollahi, 2017). No entanto, é importante ressaltar que essas são previsões *in silico* e que estudos adicionais são necessários para confirmar essas respostas e avaliar os potenciais riscos das substâncias sintéticas para a saúde humana.

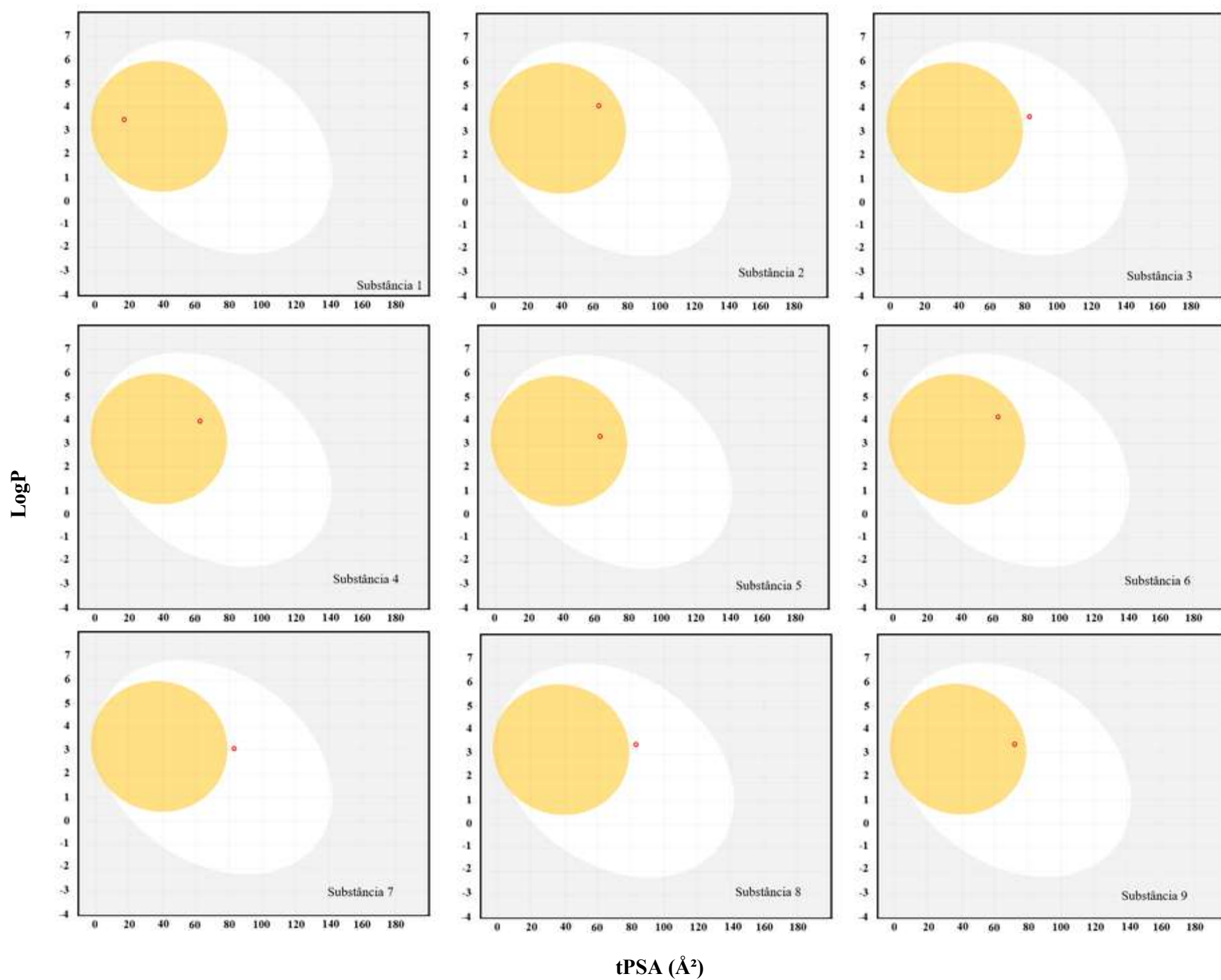
A análise da predição da permeação cerebral revelou que um menor número de substâncias sintéticas ($n = 20$, representando 80% das chalconas e $n = 4$, representando 36% dos curcuminoides) está contido dentro da elipse amarela correspondente às moléculas que permeiam o cérebro (Figuras 3, 4 e 5), sugerindo sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Saeedi e Dehpour, 2016). É importante destacar que todas as substâncias sintéticas que demonstraram permeação cerebral prevista também apresentaram uma absorção intestinal prevista elevada. Essa correlação era esperada, visto que a elipse de permeação cerebral, definida pelo método BOILED-Egg, está praticamente contida na elipse de permeação intestinal. No entanto, as substâncias **27** e **28** mostraram um valor nulo para a permeação cerebral prevista (Figura 5 e Tabela S2).

Para complementar a análise, os valores dos diferentes parâmetros físico-químicos foram comparados entre as substâncias sintéticas com permeabilidade intestinal prevista e aquelas sem tal previsão. Conforme detalhado na Tabela S1, vários parâmetros, incluindo peso molecular (PM), número de ligações com rotação livre (nRotB), número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD), refratividade molar

(Rm), área superficial polar topológica (tPSA), lipofilicidade (LogP) e solubilidade (LogS), discriminam entre as substâncias com e sem previsão de permeação cerebral. As chalconas sintéticas sem previsão de permeação cerebral mostraram ter um peso molecular, refratividade molar, lipofilicidade e solubilidade notavelmente menores em comparação com suas contrapartes que apresentaram previsão de permeação cerebral, embora tenham exibido um maior número de ligações com rotação livre, número de aceptores de ligação de hidrogênio, número de doadores de ligação de hidrogênio e área superficial polar topológica (Tabela S1). No entanto, tal relação não pode ser estabelecida para os curcuminoides sintéticos, como indicado na Tabela S2.

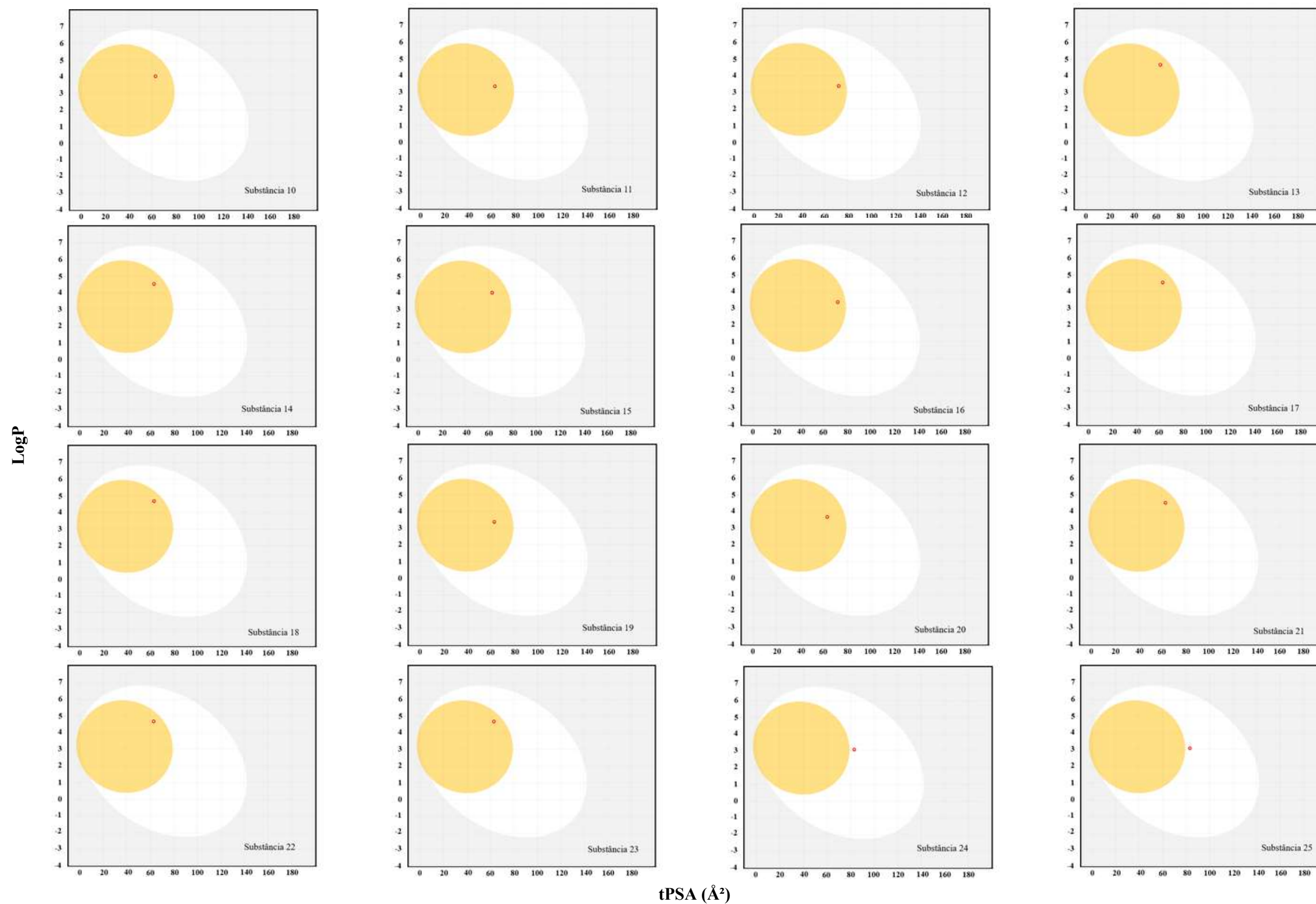
No que diz respeito à permeação intestinal, todas as substâncias sintéticas apresentaram alta permeação intestinal prevista, com exceção da substância sintética **29**. Isso sugere que a maioria das substâncias é capaz de atravessar a barreira intestinal com facilidade. No entanto, ao contrário do que foi observado com a previsão da permeação cerebral, não foi possível estabelecer uma relação clara entre os parâmetros físico-químicos e a permeabilidade intestinal das substâncias sintéticas, conforme evidenciado nas Tabelas S1 e S2. É importante destacar que o número de substâncias sintéticas que penetram no cérebro é ligeiramente inferior ao número de substâncias que penetram no intestino. Esse fenômeno provavelmente reflete a maior rigorosidade dos critérios físico-químicos para a entrada no cérebro em comparação com os exigidos para a absorção intestinal. Especificamente, no que diz respeito à polaridade, o valor do tPSA (área superficial polar topológica) deve ser idealmente inferior a 60-70 Å² para permitir a permeação cerebral, enquanto o limiar do tPSA é mais elevado, ou seja, 120 Å², para a absorção intestinal (Kelder et al., 1999; Chedik et al., 2017). Além disso, os métodos computacionais baseados em descritores moleculares, como lipofilicidade e polaridade, originalmente desenvolvidos para medicamentos (Cheng et al., 2013; Chedik et al., 2017), podem ser úteis na previsão da permeação intestinal e cerebral de potenciais herbicidas. No entanto, são necessários mais estudos para validar as abordagens *in silico*, considerando as condições reais de exposição ambiental aos herbicidas, ou seja, doses baixas e/ou crônicas de misturas de pesticidas.

Figura 3. Distribuição gráfica das chalconas (1-9) utilizando o modelo preditivo BOILED-Egg para permeação intestinal e cerebral.



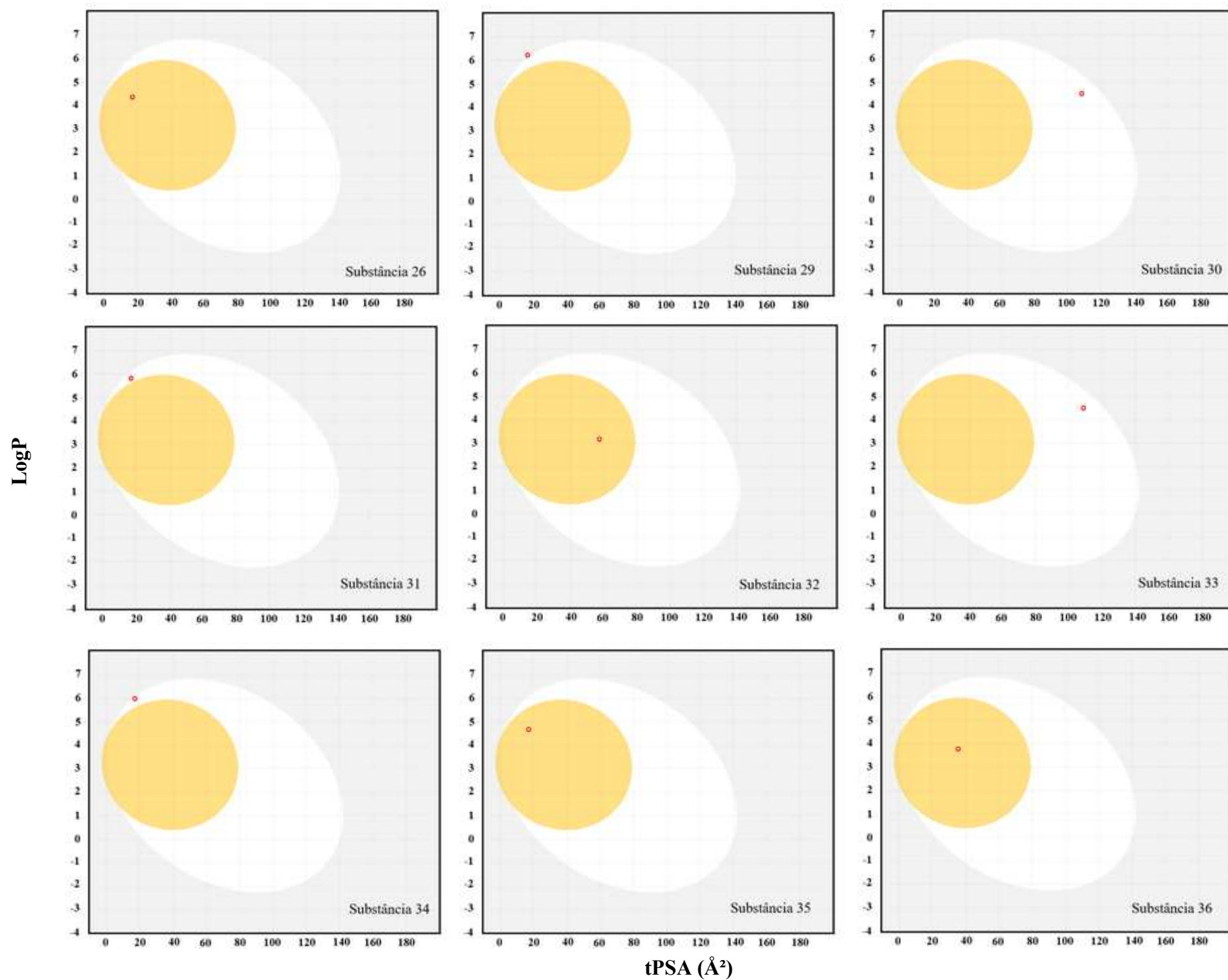
*Cada substância sintética corresponde a um pequeno círculo vermelho. A região branca representa o espaço físico-químico previsto para alta absorção intestinal demonstrada pelas substâncias, enquanto a região amarela indica a previsão de permeabilidade cerebral. Os parâmetros tPSA (área de superfície polar topológica) e LogP (valor de LogP calculado segundo o método Wildman-Crippen) são usados na análise.

Figura 4. Distribuição gráfica das chalconas (10-25) utilizando o modelo preditivo BOILED-Egg para permeação intestinal e cerebral.



*Cada substância sintética corresponde a um pequeno círculo vermelho. A região branca representa o espaço físico-químico previsto para alta absorção intestinal demonstrada pelas substâncias, enquanto a região amarela indica a previsão de permeabilidade cerebral. Os parâmetros tPSA (área de superfície polar topológica) e LogP (valor de LogP calculado segundo o método Wildman-Crippen) são usados na análise.

Figura 5. Distribuição gráfica das curcuminoides (26-36) utilizando o modelo preditivo BOILED-Egg para permeação intestinal e cerebral.



*Cada substância sintética corresponde a um pequeno círculo vermelho. A região branca representa o espaço físico-químico previsto para alta absorção intestinal demonstrada pelas substâncias, enquanto a região amarela indica a previsão de permeabilidade cerebral. Os parâmetros tPSA (área de superfície polar topológica) e LogP (valor de LogP calculado segundo o método Wildman-Crippen) são usados na análise. Os gráficos das substâncias 27 e 28 foram omitidos, pois apresentam um valor nulo tanto para a absorção intestinal quanto para a permeação cerebral prevista.

1.5 Conclusão

Em conclusão, os resultados demonstram que chalconas e curcuminoides têm o potencial tanto de inibir quanto de estimular o crescimento inicial de alface, dependendo da estrutura molecular e concentração da substância sintética analisada. Além disso, as substâncias sintéticas com potencial fitotóxico apresentaram parâmetros físico-químicos dentro dos limites propostos pela 'regra dos cinco de Tice' para biodisponibilidade de herbicidas. No entanto, a ausência de uma correlação clara entre esses parâmetros e a atividade biológica sugere que outros fatores podem ter influenciado os resultados. Por meio da ferramenta de predição *in silico* online para permeação intestinal e cerebral humana, verificou-se que as substâncias sintéticas exibem alta absorção intestinal e alta permeação cerebral, sugerindo que a exposição humana a tais substâncias provavelmente resultará em toxicidade. Essas descobertas ressaltam a importância de pesquisas adicionais, enfatizando o desenvolvimento de novos herbicidas e reguladores de crescimento vegetal. O uso de substâncias simples, como as mencionadas, que permitem modificações moleculares facilitadas, torna-se crucial para os avanços nessa área.

1.6 Referências

- ANAND, N., SINGH, P., SHARMA, A., TIWARI, S., SINGH, V., SINGH, D. K., SRIVASTAVA, K.K., SINGH, B.N. e TRIPATHI, R. P., 2012. Synthesis and evaluation of small libraries of triazolymethoxy chalcones, flavanones and 2-aminopyrimidines as inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 17, pp. 5120–5163.
- AVRAM, F., FUNAR-TIMOFEI, S., BOROTA, A., CHENNAMANENI, S.R., MANCHALA, A.K. E MURESAN, S., 2014. Quantitative estimation of pesticide-likeness for agrochemical discovery. *Journal of Cheminformatics*, vol. 6, no. 42, pp. 1-11.
- BENNETT, R., PHIPPS, R., STRANGE, A. e GREY, P., 2004. Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet: a life-cycle assessment. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 2, pp. 273–278.
- BITENCOURT, H.R., SANTOS, L.S. e SOUZA FILHO, A.P.S., 2007. Allelopathic of synthetic chalcone, its precursors and of related cetones and aldehydes. *Planta Daninha*, vol. 25, no. 4, p.747-753.
- BORELLA, J. e PASTORINI, L.H., 2010. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 34, no. 5, pp. 1129-1135.
- CÂNDIDO, A.C.S., SCHMIDT, V., LAURA, V.A., FACCENDA. O., HESS, S.C., SIMIONATTO, E. e PERES, M.T.L.P., 2010. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna*

occidentalis (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 24, no. 1, pp. 235-242.

CHARUDATTAN, R., 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, vol. 46, pp. 229–260.

CHEDIK, L., MIAS-LUCQUIN, D., BRUYERE, A. e FARDEL, O., 2017. In Silico Prediction for Intestinal Absorption and Brain Penetration of Chemical Pesticides in Humans. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 14, n. 7, pp. 708.

CHENG, F., LI, W., LIU, G. e TANG, Y., 2013. In silico ADMET prediction: Recent advances, current challenges and future trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 13, pp. 1273–1289.

CHUNG, I.M., AHN, J.K. e YUN, S.J., 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, vol. 20, no. 10, pp. 921–928.

CUONG, N.V., HAN, P.N.N., HOANG, N.K. e GIANG, N.N.L., 2015. Preparation, characterization and antibacterial curcumina encapsulated chitosan-PAA silver nanocomposite films. In: V. TOI, T. LIEN PHUONG, eds. *5th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam*. IFMBE Proceedings: Springer International Publishing, p. 58-61.

DAINA, A. e ZOETE V.A., 2016. BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, vol. 11, n. 11, pp. 1117-21.

DAINA, A., MICHIELIN, O. e ZOETE, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, n. 7, pp. 42717.

DAYAN, F.E. e DUKE, S.O., 2014. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant Physiology*, vol. 166, pp. 1090–1105.

DÍAZ-TIELAS, C., SOTELO, T., GRAÑA, E., REIGOSA, M.J. e SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M., 2014. Phytotoxic Potential of Trans-chalcone on Crop Plants and Model Species. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 33, no. 2, pp. 181-194.

ESATBEYOGLU, T., REHBERG, C., ULBRICH, K., RIMBACH, G. e ROHN, S., 2015. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food & Function*, vol. 6, no. 3, pp. 887-893.

FERREIRA, A.G. e AQUILA, M.E., 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 12, pp. 175-204.

GOMES, A.S., OLIVEIRA, S.C.C., MENDONÇA, I.S., SILVA, C.C., GUIOTTI, N.X., MELO, L.R., SILVA, W.A. e BORGHETTI, F., 2017. Potential herbicidal effect of synthetic chalcones on the initial growth of sesame, *Sesamum indicum* L., and brachiaria, *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster. *Iheringia, Série Botânica*, vol. 73, no. 1, pp. 46-52.

IBÁÑEZ, M.D. e BLÁZQUEZ, M.A., 2019. Ginger and turmeric essential oils for weed control and food crop protection. *Plants*, vol. 8, n. 3, pp. 1-14.

KELDER, J., GROOTENHUIS, P.D., BAYADA, D.M., DELBRESSINE, L.P. e PLOEMEN, J. P., 1999. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharmaceutical Research*, vol. 16, pp. 1514–1519.

LEE, W. e LEE, D.G., 2014. Antifungal Mechanism of Curcumin Lies in Membrane Targeted Action Within *Candida albicans*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, vol. 66, no. 11, pp. 780-785.

LIARAS, K., GERONITAKI, A., GLAMOCLIIJA, J., CIRIC, A. e SOKOVIC, M., 2011. Thiazole-based chalcones as potent antimicrobial agents. Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 10, pp. 3135–3140.

LIPINSKI, C.A., 2004. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug discovery today: Technologies*, vol. 1, no. 4, pp. 337-341.

LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W. e FEENEY, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 4-17.

MAHANTA, B.P., KEMPRAI, P., BORA, P.K., LAL, M. e HALDAR, S., 2022. Phytotoxic essential oil from black turmeric (*Curcuma caesia* Roxb.) rhizome: Screening, efficacy, chemical basis, uptake and mode of transport. *Industrial Crops and Products*, vol. 180, pp. 1-12.

MONACO, T.J., WELLER, S.C. e ASHTON, F.M., 2002. *Weed Science: Principles and Practices*, 4th ed. 685 p. John Wiley & Sons, Inc., New York.

MOSTAFALOU, S. e ABDOLLAHI, M., 2017. Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Archives Toxicology*. vol. 91, pp. 549–599.

PIMENTEL, D., ZUNIGA, R. e MORRISON, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, vol. 52, pp. 273–288.

RAJCAN, I. e SWANTON, C.J., 2001. Understanding maize–weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. *Field Crops Research*, vol. 71, pp. 139–150.

REIGOSA, M., GOMES, A.S., FERREIRA, A.G. e BORGHETTI, F., 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 27, no. 4, pp. 629-646.

ROLI, E., MARIESCHI, M., MAIETTI, S., SACCHETTI, G., e BRUNI, R., 2014. Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre-and post-emergence development of *Solanum lycopersicum* L.: A multivariate approach. *Industrial Crops and Products*, vol. 60, pp. 280-290.

SAEEDI SARAVID, S.S. e DEHPUR, A.R., 2016. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sciences*, vol. 145, pp. 255–264.

SANTOS, J.C.F, SOUZA, I.F., MENDES, A.N.G., MORAIS, A.R., CONCEIÇÃO, H.E.O. e MARINHO, J.T.S., 2002. Efeito de extratos de cascas de café de arroz na emergência e no crescimento de caruru-de-manha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 6, pp. 783-790.

SILVA, V.S., CÂNDIDO, A.C.S., MULLER, C., LAURA, V.S., FACCENDA, O., SIMIONATTO, E., HESS, S.C. e PERES, M.T.L.P., 2011. Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa*. *Acta Botanica Brasilica*, vol. 25, no. 1, pp. 95-104.

SORDILLO, P.P. e HELSON, L., 2015. Curcumin suppression of cytokine release and cytokine storm. A potential therapy for patients with Ebola and other severe viral infections. *In Vivo*, vol. 29, no. 1, pp. 1-4.

SOUZA FILHO, A.P.S., RODRIGUES, L.R.A. e RODRIGUES, T.S., 1996. Efeitos de extratos aquosos de assa-Peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. *Planta Daninha*, vol. 14, no. 2, pp. 93–101.

TEIXEIRA, R.R., PEREIRA, W.L., TOMAZ, D.C., OLIVEIRA, F.M., GIBERTI, S. e FORLANI, G., 2013. Synthetic analogues of the natural compound cryphonectric acid interfere with photosynthetic machinery through two different mechanisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, no. 23, pp. 5540-5549.

TICE, C.M., 2001. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals?. *Pest Management Science*, vol. 57, no. 1, pp. 3-16.

TILMAN, D., CASSMAN, K.G., MATSON, P.A., NAYLOR, R. e POLASKY, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, vol. 418, pp. 671–677.

VEBER, D.F., JOHNSON, S.R., CHENG, H-Y., SMITH, B.R., WARD, K.W. e KOPPLE, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 2615-2623.

YAYLI, N., ÜÇÜNCÜ, O., AYDIN, E., GÖK, Y., YASAR, A., BALTACI, C., YILDIRIM, N. e KÜCÜK, M., 2005. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the oxidant activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, vol. 169, no. 3, pp. 229-234.

ZAIDI, S.N.F. e MAHBOOB, T., 2015. Effect of curcumin supplementation on antioxidant enzymes in liver cirrhosis: study in rats. *Pakistanian Journal of Biochemical & Molecular Biology*, vol. 48, no. 1, pp. 3-6.

ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall. 944 p.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Parâmetros físico-químicos das chalconas sintéticas obtidos através do preditor SwissADME.

Substância	Notação SMILES	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Número de átomos pesados	Número de átomos pesados aromáticos	Csp3	nRotB	HBA	HBD	Rm	tPSA (Å²)	LogP	LogS	Permeação intestinal	Permeação cerebral
1	<chem>O=C(\C=C\C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	C ₁₅ H ₁₂ O	208,3	16	12	0	3	1	0	66,3	17,1	3,5	-5,0	Alta	Sim
2	<chem>BrC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₀ BrNO ₃	332,2	20	12	0	4	3	0	82,8	62,9	4,1	-5,2	Alta	Sim
3	<chem>FC1CCC(C(C1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-])O</chem>	C ₁₅ H ₁₀ FNO ₄	287,2	21	12	0	4	5	1	77,1	83,1	3,7	-4,0	Alta	Não
4	<chem>FC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₀ FNO ₃	271,2	20	12	0	4	4	0	75,0	62,9	3,9	-4,6	Alta	Sim
5	<chem>O=C(C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCCCC1</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	253,3	19	12	0	4	3	0	75,1	62,9	3,4	-4,3	Alta	Sim
6	<chem>BrC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₀ BrNO ₃	332,2	20	12	0	4	3	0	82,8	62,9	4,1	-5,2	Alta	Sim
7	<chem>OC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,3	20	12	0	4	4	1	77,1	83,1	3,1	-3,8	Alta	Não
8	<chem>O=C(\C=C\C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	C ₁₆ H ₁₃ NO ₄	283,3	21	12	0,1	4	4	1	82,1	83,1	3,4	-4,1	Alta	Não
9	<chem>COC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₆ H ₁₃ NO ₄	283,3	21	12	0,1	5	4	0	81,6	72,1	3,4	-4,5	Alta	Sim
10	<chem>CLC1CCC(CC1)C(=O)/C=C/C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₀ ClNO ₃	287,7	20	12	0	4	3	0	80,1	62,9	4,0	-4,9	Alta	Sim
11	<chem>O=C(C1CCCCC1)/C=C/C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	253,3	19	12	0	4	3	0	75,1	62,9	3,4	-4,3	Alta	Sim
12	<chem>COC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₆ H ₁₃ NO ₄	283,3	21	12	0,1	5	4	0	81,6	72,1	3,4	-4,5	Alta	Sim
13	<chem>O=C(C1CCC(C(C1)Cl)Cl)/C=C/C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₉ Cl ₂ NO ₃	322,1	21	12	0	4	3	0	85,1	62,9	4,7	-5,5	Alta	Sim
14	<chem>O=C(C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCCC2C1CCCC2</chem>	C ₁₉ H ₁₃ NO ₃	303,3	23	16	0	4	3	0	92,6	62,9	4,5	-6,0	Alta	Sim
15	<chem>ClC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₀ ClNO ₃	287,7	20	12	0	4	3	0	80,1	62,9	4,0	-4,9	Alta	Sim
16	<chem>COC1CCC(CC1)C(=O)/C=C/C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₆ H ₁₃ NO ₄	283,3	21	12	0,1	5	4	0	81,6	72,1	3,4	-4,5	Alta	Sim
17	<chem>O=C(C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCCC2C1CCCC2</chem>	C ₁₉ H ₁₃ NO ₃	303,3	23	16	0	4	3	0	92,6	62,9	4,5	-6,0	Alta	Sim
18	<chem>O=C(C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCC(C(C1)Cl)Cl</chem>	C ₁₅ H ₉ Cl ₂ NO ₃	322,1	21	12	0	4	3	0	85,1	62,9	4,7	-5,5	Alta	Sim
19	<chem>O=C(C1CCCCC1)/C=C/C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	253,3	19	12	0	4	3	0	75,1	62,9	3,4	-4,3	Alta	Sim
20	<chem>CC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃	267,3	20	12	0,1	4	3	0	80,0	62,9	3,7	-4,7	Alta	Sim
21	<chem>O=C(C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCC2C(C1)CCCC2</chem>	C ₁₉ H ₁₃ NO ₃	303,3	23	16	0	4	3	0	92,6	62,9	4,5	-6,0	Alta	Sim
22	<chem>O=C(C1CCC(C(C1)Cl)Cl)/C=C/C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₉ Cl ₂ NO ₃	322,1	21	12	0	4	3	0	85,1	62,9	4,7	-5,5	Alta	Sim
23	<chem>O=C(C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-])/C=C/C1CCC(C(C1)Cl)Cl</chem>	C ₁₅ H ₉ Cl ₂ NO ₃	322,1	21	12	0	4	3	0	85,1	62,9	4,7	-5,5	Alta	Sim
24	<chem>O=C(C1CCCCC1)/C=C/C1CC(CCC1O)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,3	20	12	0	4	4	1	77,1	83,1	3,1	-3,8	Alta	Não
25	<chem>OC1CCCC(C1)/C=C/C(=O)C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,3	20	12	0	4	4	1	77,1	83,1	3,1	-3,8	Alta	Não

*Peso molecular (PM), fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), número de ligações com rotação livre (nRotB), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), refratividade molar (Rm), polaridade (tPSA), lipofilicidade (LogP) e solubilidade (LogS).

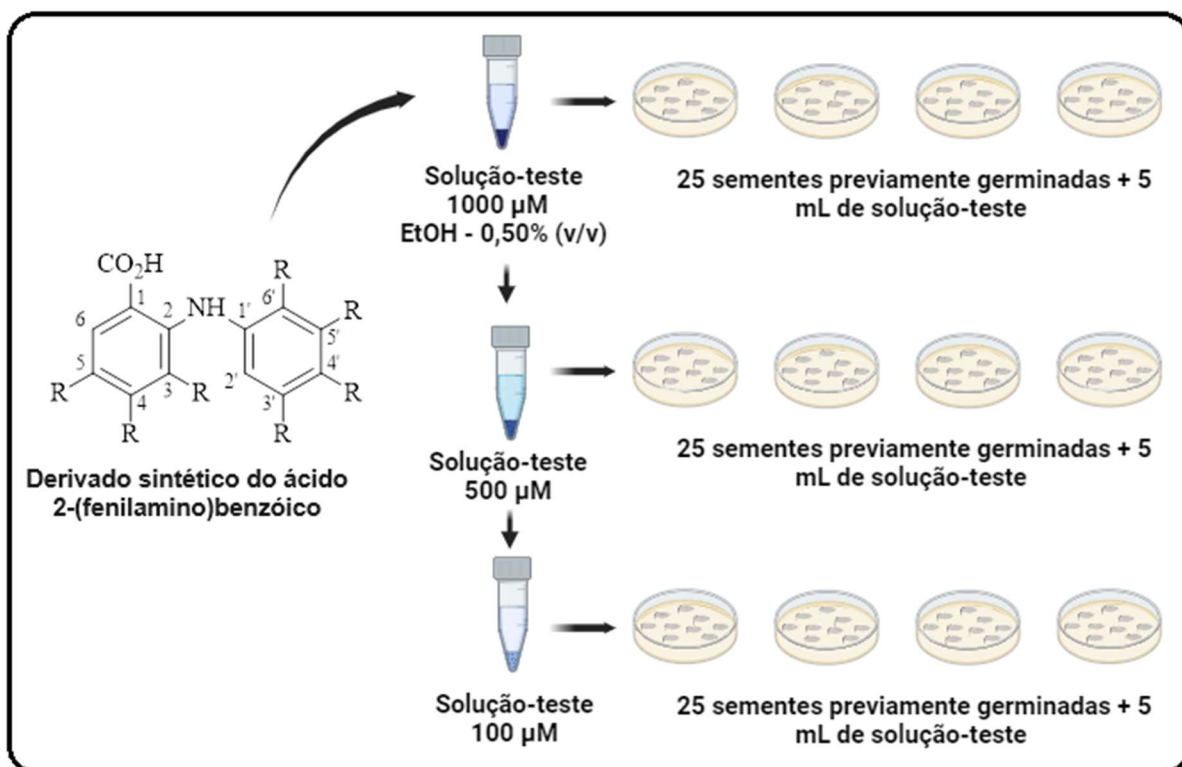
Tabela S2. Parâmetros físico-químicos das curcuminas sintéticas obtidos através do preditor SwissADME.

Substância	Notação SMILES	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Número de átomos pesados	Número de átomos pesados aromáticos	Csp3	nRotB	HBA	HBD	Rm	tPSA (Å²)	LogP	LogS	Permeação intestinal	Permeação cerebral
26	<chem>O=C(/C=C/C1CCC(CC1)C)/C=C/C1CCC(CC1)C</chem>	C ₁₉ H ₁₈ O	262,4	20	12	0,1	4	1	0	85,9	17,1	4,4	-5,8	Alta	Sim
27	<chem>COC1CCC(CC1)/C=C/1\CCC/C(=C\C2CCC(CC2)OC)/C1=O</chem>	C ₂₂ H ₂₂ O ₃	334,4	25	12	0,2	4	3	0	101,3	35,5	4,7	-	-	-
28	<chem>N#CC1CCC(CC1)/C=C/1\CCC/C(=C\C2CCC(CC2)C#N)/C1=O</chem>	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O	324,4	25	12	0,1	2	3	0	97,7	64,7	4,4	-	-	-
29	<chem>O=C1/C(=C/C2CCC(CC2)Br)/CCC/C/1=C\C1CCC(CC1)Br</chem>	C ₂₀ H ₁₆ Br ₂ O	432,2	23	12	0,2	2	1	0	103,7	17,1	6,2	-8,1	Baixa	Não
30	<chem>O=C1/C(=C/C2CCC(CC2)[N+](=O)[O-])/CCC/C/1=C\C1CCC(CC1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	364,4	27	12	0,2	4	5	0	105,9	108,7	4,5	-5,2	Alta	Não
31	<chem>O=C1/C(=C/C2CCC(CC2)F)/CCC/C/1=C\C1CCC(CC1)F</chem>	C ₂₀ H ₁₆ F ₂ O	310,3	23	12	0,2	2	3	0	88,2	17,1	5,8	-7,1	Alta	Não
32	<chem>O=C(/C=C/C1CCCCC1O)/C=C/C1CCCCC1O</chem>	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	266,3	20	12	0	4	3	2	80,0	57,5	3,9	-3,9	Alta	Sim
33	<chem>O=C1/C(=C/C2CCCC(C2)[N+](=O)[O-])/CCC/C/1=C\C1CCCC(C1)[N+](=O)[O-]</chem>	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	364,4	27	12	0,2	4	5	0	105,9	108,7	4,5	-5,2	Alta	Não
34	<chem>O=C1/C(=C/C2CCC(CC2)Cl)/CCC/C/1=C\C1CCC(CC1)Cl</chem>	C ₂₀ H ₁₆ Cl ₂ O	343,3	23	12	0,2	2	1	0	98,3	17,1	6,0	-7,7	Alta	Não
35	<chem>O=C1/C(=C/C2CCCCC2)/CCC/C/1=C\C1CCCCC1</chem>	C ₂₀ H ₁₈ O	274,4	21	12	0,2	2	1	0	88,3	17,1	4,7	-6,5	Alta	Sim
36	<chem>COC1CCC(CC1)/C=C/C(=O)/C=C/C1CCC(CC1)OC</chem>	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294,3	22	12	0,1	6	3	0	88,9	35,5	3,8	-5,3	Alta	Sim

* Peso molecular (PM), fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), número de ligações com rotação livre (nRotB), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), refratividade molar (Rm), polaridade (tPSA), lipofilicidade (LogP) e solubilidade (LogS).

CAPÍTULO 3

Potencial herbicida de diarilaminas derivadas de ácido antranílico



Resumo visual da seção Materiais e Métodos

Potencial herbicida de diarilaminas derivadas de ácido antranílico

1.1 Resumo

Este estudo explorou a atividade fitotóxica de 23 diarilaminas sintéticas derivadas de ácido antranílico, nas concentrações de 1000, 500 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no crescimento inicial de duas eudicotiledôneas, alface (*Lactuca sativa* L.) e nabiça (*Raphanus raphanistrum* L.), e de uma monocotiledônea, capim amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde). Também foi analisada a correlação entre as propriedades físico-químicas dessas substâncias com a absorção intestinal e cerebral *in silico*. Além disso, as substâncias com maior fitotoxicidade tiveram sua ecotoxicidade avaliada em zooplâncton. As diarilaminas derivadas de ácido antranílico, substâncias **1, 2, 3, 4, 5, 19, 20, 21, 22 e 23** demonstraram atividade inibitória significativa no crescimento inicial das plantas-alvo, especialmente na maior concentração avaliada (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A análise das propriedades físico-químicas das substâncias sugeriu que elas compartilham características estruturais com herbicidas comerciais, o que pode ser relevante para a descoberta de novas substâncias herbicidas. Em contrapartida, a predição *in silico* da absorção intestinal e cerebral das substâncias sintéticas demonstrou que as substâncias exibem alta absorção intestinal e cerebral prevista. No entanto, os ensaios de ecotoxicidade em zooplâncton não revelaram impactos adversos significativos das quatro substâncias analisadas, substâncias **1, 2, 3 e 4**, nas comunidades de organismos aquáticos. Portanto, observamos que diarilaminas derivadas de ácido antranílico possuem potencial como herbicidas, sendo potencialmente seguros para o ambiente aquático.

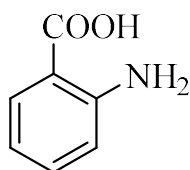
Palavras-chave: fitotoxicidade, antranilato, nabiça, capim amargoso.

1.2 Introdução

As plantas daninhas representam uma das maiores dificuldades enfrentadas na agricultura mundial. Essas plantas competem diretamente com as culturas agrícolas por recursos essenciais como água, nutrientes, espaço e luz solar, o que resulta em uma redução significativa nos rendimentos das colheitas (Vyvyan, 2002; Bauscom e Holt, 2009). Para suprir a crescente demanda por alimentos, os agricultores têm recorrido aos produtos químicos sintéticos para controlar as pragas e as plantas daninhas (Gianessi, 2013; Duke e Dayan, 2022). Recentemente, os cientistas têm se dedicado à busca por novos herbicidas, sejam eles naturais, semissintéticos ou sintéticos (Dayan et al., 2009; Dayan e Duke, 2014; Dayan, 2019; Roireau et al., 2020; Wilms et al., 2020). Nesse sentido, várias classes de substâncias químicas estão sendo investigadas (Dayan e Duke, 2014). No entanto, há uma demanda considerável por herbicidas que apresentem estruturas centrais inovadoras e que possuam modos de ação específicos ou inéditos (Duke et al., 2000, Dayan, 2019, Qu et al., 2021, Duke e Dayan, 2022).

O antranilato (Fig. 1) é um dos metabólitos intermediários na rota biossintética do ácido chiquímico, que desempenha um papel crucial na conversão do corismato para formar o aminoácido triptofano em plantas, bactérias e fungos (Li e Last, 1996). Esta via é de vital importância para a sobrevivência das plantas, uma vez que o triptofano é essencial para a síntese de proteínas e serve como precursor para uma variedade de substâncias bioativas, incluindo o ácido indolacético (IAA), um hormônio vegetal essencial para a expansão celular, manutenção da dominância apical e outros processos regulatórios (Thomas, 1984). Sua relevância na agricultura é ressaltada por sua ampla gama de propriedades biológicas. Estudos prévios evidenciam que o antranilato possui a capacidade de aumentar o teor de açúcar na cana-de-açúcar, acelerar o amadurecimento de frutos, regular o crescimento das plantas, aumentar o rendimento de frutos e conferir resistência à geada, além de exibir atividade herbicida contra várias espécies (Thomas, 1984; Li e Last, 1996; Siehl et al., 1997).

Figura 1. Estrutura molecular do antranilato (ácido antranílico).



Em relação à fitotoxicidade, há relatos que indicam que os antranilatos sintéticos atuam como moduladores do crescimento de plantas. Entre esses, destacam-se o ácido 6-metilantranílico e seus derivados, como o ácido 5-metilantranílico, o ácido 4-metilantranílico e o ácido 3-metilantranílico, que apresentaram potencial fitotóxico (Thomas, 1984; Siehl et al., 1997). No entanto, é importante observar que o grau de fitotoxicidade dessas substâncias varia de acordo com as concentrações aplicadas, as especificidades das estruturas químicas e as espécies vegetais avaliadas.

Neste estudo, investigou-se o potencial fitotóxico de 23 derivados sintéticos de antranilato, avaliando seus efeitos no crescimento inicial de duas espécies eudicotiledôneas, *Lactuca sativa* L. (alface) e *Raphanus raphanistrum* L. (nabiça), e de uma monocotiledônea, *Digitaria insularis* (L.) Fedde (capim amargoso). Adicionalmente, realizou-se uma análise comparativa das propriedades físico-químicas desses derivados sintéticos com a “regra dos cinco de Tice” para biodisponibilidade de pequenas substâncias com potencial herbicida. Para compreender melhor o potencial de absorção e toxicidade humana das substâncias, conduzimos previsões *in silico* da permeabilidade intestinal e absorção cerebral em humanos. Além disso, avaliou-se a atividade ecotoxicológica dos derivados sintéticos em zooplâncton, proporcionando uma visão de seus possíveis impactos no ambiente aquático.

1.3 Material e Métodos

1.3.1 Síntese das substâncias sintéticas utilizadas nos testes de fitotoxicidade

As diarilaminas derivadas de ácido antranílico utilizados nos ensaios de fitotoxicidade, substâncias (**1-23**), foram cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP. A nomenclatura das substâncias sintéticas está detalhada na Tabela 1.

1.3.2 Preparação das soluções das substâncias utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade

Cada diarilamina derivada de ácido antranílico (**1- 23**) (Fig. 2) foi solubilizado em 0,50% (v/v) de etanol (EtOH). Após a solubilização, as suspensões foram agitadas vigorosamente e, em seguida, transferidas para balões volumétricos. O volume foi completado com água destilada para alcançar a concentração final de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$, configurando a solução utilizada para a triagem das substâncias sintéticas. Para as substâncias mais fitotóxicas foram

realizados ensaios nas concentrações de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a partir da diluição da solução mais concentrada.

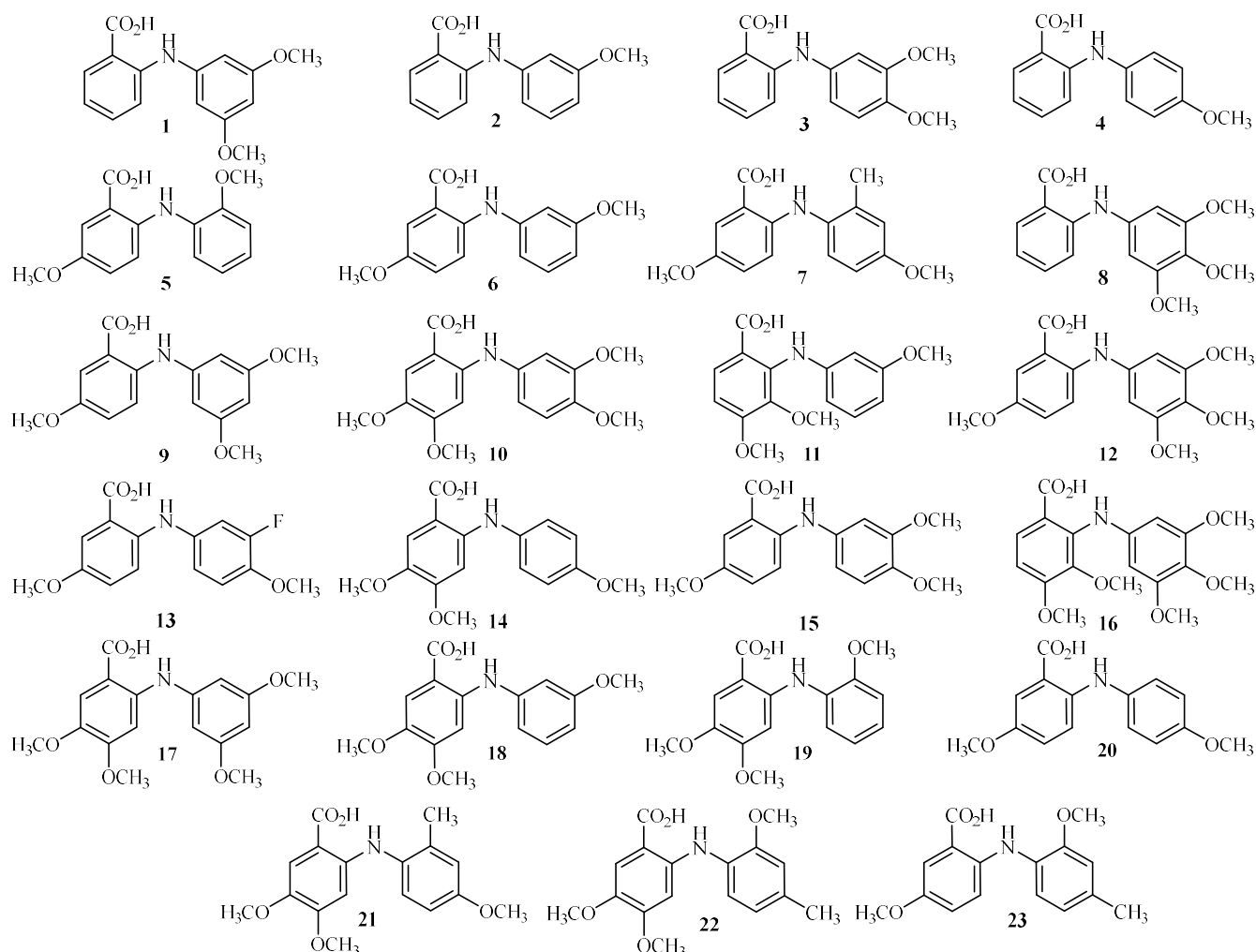
1.3.3 Características físico-químicas das soluções-teste

A fim de considerar a potencial influência dos grupos químicos presentes nas substâncias sobre o pH, foram avaliadas as características físico-químicas das soluções-teste. Essa análise é importante, pois variações no pH podem, por si só, resultar em efeitos fitotóxicos (Souza Filho et al., 1996). Para tal, o pH das soluções foi determinado nas concentrações mencionadas anteriormente, utilizando o pHmêtro TEC-2 da Tecnal, Brasil. Além disso, a condutividade elétrica das soluções-teste foi avaliada em condutivímetro digital portátil modelo CD-850, marca Instrutherm.

1.3.4 Espécie-alvo

Foram adquiridas sementes comerciais de três espécies vegetais distintas, nomeadamente: alface (*Lactuca sativa*), nabiça (*Raphanus raphanistrum*) e capim amargoso (*Digitaria insularis*).

A seleção de *L. sativa* neste estudo justifica-se com base em suas características singulares, que a tornam particularmente apropriada para a detecção de efeitos tóxicos em concentrações diminutas de substâncias de teste. Trata-se de uma espécie com crescimento inicial rápido e alto grau de sensibilidade, que permite expressar os resultados em baixas concentrações das substâncias avaliadas (Ferreira e Aquila, 2000). A nabiça (*R. raphanistrum*) foi selecionada devido a sua notável capacidade competitiva e a frequente infestação de cultivos (especialmente de cereais de inverno), associadas à produção abundante de sementes viáveis. No cenário brasileiro, esta planta prospera principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Gazziero et al., 2015). O capim amargoso (*D. insularis*) foi incorporado a este estudo devido à sua relevância como uma das principais plantas daninhas em áreas de cultivo. Esta espécie apresenta uma vasta distribuição geográfica no Brasil, colonizando pastagens, áreas de cultivo anual e perene. Adicionalmente, *D. insularis* é amplamente reconhecida pela sua considerável habilidade de dispersão, o que a torna um alvo de grande relevância para estudos de fitotoxicidade (Gazziero et al., 2015).

Figura 2. Estrutura molecular das diarilaminas derivadas de ácido antranílico.

1.3.5 Triagem de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial de alface

A triagem das diarilaminas derivadas de ácido antranílico (**1-23**) para avaliação de seu potencial fitotóxico foi realizada em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, previamente submetidas a um processo de desinfecção, incluindo imersão em hipoclorito de sódio a 2% seguido de enxágue com água destilada e etanol a 70%. Após a desinfecção, as placas foram deixadas para secar a temperatura ambiente, e uma folha de papel filtro previamente autoclavada foi colocada em cada placa. Cada tratamento consistiu em quatro repetições, com 25 plântulas de *L. sativa* previamente germinadas (com protrusão radicular de 2 mm) em cada, as quais foram expostas a 5 mL de solução-teste na concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. O controle veículo consistiu em uma solução aquosa contendo 0,50% (v/v) de etanol, isenta de qualquer

substância avaliada. As placas de Petri foram incubadas em germinador modelo 102 FC da Eletrolab, mantido a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, no escuro, durante 4 dias. Os parâmetros analisados englobaram o comprimento da raiz principal e da parte aérea, com as plântulas submetidas a congelamento a -10°C antes das medições para evitar crescimento subsequente.

1.3.6 Avaliação do potencial fitotóxico de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial

A fitotoxicidade de quatro diarilaminas derivadas de ácido antranílico (**1-4**) que demonstraram maior fitotoxicidade durante a triagem, foi avaliada no crescimento inicial de *L. sativus* (alface), *R. raphanistrum* (nabiça) e *D. insularis* (capim amargoso). Os tratamentos foram conduzidos em placas de Petri, contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 5 mL da solução-teste e 25 sementes germinadas de cada espécie de planta, todas com 2 mm de protrusão radicular. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento, totalizando 100 plântulas em cada grupo experimental.

As substâncias foram solubilizadas em EtOH (0,5%) e, em seguida, o volume foi completado com água destilada para atingir concentrações de 1000, 500 e $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. As placas de Petri foram então colocadas em câmara de germinação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C})$, com um fotoperíodo de 12 horas, por um período de 4 dias para a alface e nabiça e 7 dias para o capim amargoso, seguindo um delineamento experimental completamente casualizado. Antes das medições, as plântulas foram submetidas a um congelamento a -10°C para impedir qualquer crescimento adicional.

Para fins de comparação, a toxicidade do glifosato (N-(fosfonometil)glicina) da marca Sigma-Aldrich (herbicida de referência) também foi avaliada nas mesmas concentrações de teste. Como controle veículo, utilizou-se água destilada com EtOH (0,5%). Após os tratamentos, realizou-se a medição do comprimento da raiz principal e da parte aérea das plântulas.

1.3.7 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição ADME de diarilaminas derivadas de ácido antranílico

Utilizamos o preditor SwissADME (www.swissadme.ch/, acessado em 03 de janeiro de 2024) para prever a absorção gastrointestinal (alta ou baixa) e a penetração cerebral (sim ou não) das substâncias sintéticas e do glifosato. Essas previsões foram realizadas com base no

método BOILED-Egg, que utiliza uma abordagem gráfica com duas regiões elipsoidais: uma para a permeação intestinal (alta ou baixa) e outra para a permeação cerebral (sim ou não). Esse método leva em conta principalmente dois parâmetros: a lipofilicidade das substâncias, avaliada pelo coeficiente de partição (P) com um valor de LogP calculado conforme o método de Wildman-Crippen, e a polaridade, determinada por um valor calculado da área de superfície polar topológica (tPSA) (Daina e Zoete, 2016; Daina et al., 2017).

Os valores de lipofilicidade (LogP) e polaridade (tPSA), juntamente com outras características como número de átomos pesados, número de átomos pesados aromáticos, número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), peso molecular (PM), número de ligações com rotação livre (nRotB), fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), solubilidade (LogS) e a refratividade molar (Rm), estão disponíveis na Tabela S1. Todas essas propriedades físico-químicas foram obtidas por meio do preditor SwissADME.

1.3.8 Avaliação da ecotoxicidade em zooplâncton

1.3.8.1 Coleta de sedimentos contendo ovos de zooplâncton adormecidos

Os sedimentos que continham ovos latentes de zooplâncton foram coletados em janeiro de 2017 na cidade de Angatuba, região Sudeste de São Paulo, Brasil (23°08' a 23°35'S e 48°30' a 49°13'W), nos lagos de Camargo, Cavalos, Coqueiral e Barbosa, cuja limnologia e biota são descritas na literatura (Granado e Henry, 2008; Panarelli et al., 2008). Com o intuito de amostrar a heterogeneidade espacial de ovos latentes nos lagos, foram coletadas amostras de sedimento em sete estações de coleta equidistantes ao longo de uma transecção da margem do lago, chegando até a zona pelágica de cada lago (Portinho et al., 2016). As amostras de sedimento superficial (<10 cm de profundidade) foram coletadas com um Van Veen grab (0,06 m²) e acondicionadas em sacos plásticos, em cada estação de coleta (Nielsen et al., 2003; Nielsen et al., 2007). Nas estações de coleta, foram coletados 0,04 m³ de sedimento a partir de uma área superficial de 0,4 m² (Brock et al., 2005). Posteriormente, as amostras de sedimento coletadas foram combinadas para maximizar o número de táxons disponíveis para emergência. Em seguida, as amostras de sedimento foram levemente trituradas, peneiradas (malha de 500 µm), misturadas e secas ao ar por 8 semanas (Nielsen et al., 2003; Brock et al., 2005).

1.3.8.2 Efeito de diarilaminas derivadas de ácido antranílico na emergência de zooplâncton

A toxicidade de derivados sintéticos de ácido antranílico na emergência de zooplâncton foi avaliada por meio de experimento de eclosão em laboratório. Para tanto, 50 g (peso seco) da amostra de sedimento, previamente preparada, foram adicionadas em bandejas individuais de 0,5 L e coberta com 0,3 L de solução do respectivo tratamento. Os tratamentos foram compostos por soluções-teste de diarilaminas derivadas de ácido antranílico, glifosato (formulação comercial - Roundup®), todos na concentração de 0,28 mg L⁻¹ (concentração máxima de Roundup® para irrigação e para o consumo de animais permitida pela legislação brasileira) (Resolução CONAMA, 2005) e controle veículo (água destilada). Cada tratamento foi repetido quatro vezes. As bandejas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 h (Iglesias et al., 2016). A abundância e riqueza de táxons da comunidade de zooplâncton emergida foram avaliadas após 28 dias da exposição aos tratamentos.

1.3.9 Análise estatística

O comprimento da raiz principal e da parte aérea das plântulas foi calculado como a diferença percentual média em relação ao controle veículo, utilizando a fórmula a seguir (Chung et al., 2001):

$$Diferença\ percentual\ (\%) = \frac{\text{controle} - \text{tratamento}}{\text{controle}} * 100$$

Portanto, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição em relação ao controle veículo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e à verificação da homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene ($p > 0,05$). Como essas premissas não foram atendidas as médias de cada tratamento foram comparadas entre si e com o controle veículo, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$) (Zar, 2010). As análises estatísticas foram realizadas com valores absolutos.

Para analisar o impacto das diarilaminas derivadas de ácido antranílico na emergência de zooplâncton, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (p

$< 0,05$), desde que fossem atendidas as pressuposições de normalidade dos resíduos ($p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$). Caso não se verificassem tais pressuposições, os dados foram avaliados por teste não paramétrico.

1.4 Resultados e Discussão

1.4.1 Características físico-químicas das soluções-teste

O valor de pH para o herbicida de referência, o glifosato, e o controle veículo, foi de 4,93 e 5,27, respectivamente. Enquanto as soluções-teste apresentaram uma faixa de pH entre 5,00 e 5,45 (dados individuais não apresentados). É relevante destacar que essa faixa de pH está em conformidade com as condições consideradas adequadas para o desenvolvimento de plântulas, que são utilizadas como bioindicadoras de fitotoxicidade (Borella e Pastorini, 2010).

No que se refere à condutividade elétrica, os valores para o herbicida de referência e o controle veículo foram medidos em 13,2 e 3,3 μS , respectivamente. Enquanto as soluções-teste apresentaram variações na condutividade elétrica entre 4,05 e 4,43 μS (dados individuais não apresentados), sendo, portanto, inferiores aos valores registrados para o herbicida de referência.

1.4.2 Triagem de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial de alface

Observamos que a maioria das substâncias sintéticas demonstrou atividade inibitória para o crescimento da raiz principal e/ou parte aérea de *L. sativa*, em comparação com o controle veículo, exceto pelas substâncias **10, 14, 15, 16, 17 e 18** (Tabela 1). Vale destacar que as taxas de inibição de crescimento de *L. sativa* quando tratadas com as substâncias **1, 2, 3 e 4** foram altas, alcançando valores de -94,2%, -94,2%, -85,6% e -49,9%, respectivamente, para a raiz principal, e -94,5%, -94,5%, -94,5% e -75,1% para a parte aérea (Tabela 1). Adicionalmente, as substâncias **19, 20, 21, 22 e 23** estimularam significativamente o crescimento da raiz principal de *L. sativa* (Tabela 1).

Os resultados obtidos revelaram que a atividade biológica das diarilaminas derivadas de ácido antranílico está relacionada à posição dos grupos metoxila ou metila nos anéis A ou B das substâncias sintéticas. Ao comparar as diarilaminas derivadas de ácido antranílico (conforme apresentado na Tabela 1), observou-se que as substâncias contendo o grupo metoxila na posição 5 do anel aromático A e o grupo metoxila ou metila na posição 2' e/ou 4' do anel

aromático B geralmente estimulavam o crescimento da raiz principal de *L. sativa* (como nas substâncias 19, 20, 21, 22 e 23). Embora não seja apropriado inferir que o potencial fitotóxico e o mecanismo de ação de substâncias dependem exclusivamente da posição de um único grupo funcional; vale ressaltar essas estruturas para compreender a relação entre os substituintes e a tendência da atividade das substâncias.

As diarilaminas derivadas de ácido antranílico que continham um grupo metoxila nas posições 3' e/ou 4' do anel aromático B, em contrapartida, demonstraram geralmente maior atividade inibitória para o crescimento da raiz principal de *L. sativa*. Isso indica que a introdução de um grupo doador de elétrons nas posições 3' e/ou 4' do anel benzênico B é benéfica para melhorar a atividade inibitória das substâncias. No entanto, é importante destacar que esses resultados podem variar dependendo das condições e das espécies vegetais avaliadas.

Tabela 1. Efeito das soluções de diarilaminas derivadas de ácido antranílico na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre crescimento inicial de plântulas de alface.

Substância	Nomenclatura	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
1	Ácido 2-((3,5-dimetoxifenil)amino) benzoico	-94,2 $\pm$ 0,0 k*	-94,5 $\pm$ 0,0 i*
2	Ácido 2-((3-metoxifenil)amino) benzoico	-94,2 $\pm$ 0,0 k*	-94,5 $\pm$ 0,0 i*
3	Ácido 2-((3,4-dimetoxifenil)amino) benzoico	-85,6 $\pm$ 0,0 jk*	-94,5 $\pm$ 0,0 ghi*
4	Ácido 2-((4-metoxifenil)amino) benzoico	-49,9 $\pm$ 14,6 ijk*	-75,1 $\pm$ 20,1 hi*
5	Ácido 5-metoxi-2-((2-metoxifenil) amino)benzoico	-42,1 $\pm$ 37,6 hij*	-46,7 $\pm$ 23,4 fgh*
6	Ácido 5-metoxi-2-((3-metoxifenil) amino)benzoico	-30,1 $\pm$ 30,1 ghij	-48,4 $\pm$ 21,6 fgh*
7	Ácido 5-metoxi-2-((4-metoxi-2-metilfenil)amino)benzoico	-23,8 $\pm$ 39,3 fghi	-58,8 $\pm$ 22,2 ghi*
8	Ácido 2-((3,4,5-trimetoxifenil) amino)benzoico	-17,2 $\pm$ 22,6 efghi	-35,1 $\pm$ 19,6 efg*
9	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((3-metoxifenil)amino)benzoico	-16,4 $\pm$ 30,1 efghi	-24,8 $\pm$ 17,0 def*
10	Ácido 2-((3,4-dimetoxifenil)amino)-4,5-dimetoxibenzoico	-14,8 $\pm$ 17,5 efghi	-11,9 $\pm$ 17,3 abcd
11	Ácido 3,4-dimetoxi-2-((3-metoxifenil)amino)benzoico	-3,8 $\pm$ 22,1 defgh	-18,4 $\pm$ 17,1 cde*

Substância	Nomenclatura	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
12	Ácido 5-metoxi-2-((3,4,5-trimetoxi-fenil)amino)benzoico	$-3,5 \pm 27,0$ defgh	$-25,8 \pm 15,5$ def*
13	Ácido 2-((3-fluoro-4-metoxifenil)amino)-5-metoxibenzoico	$2,4 \pm 48,0$ defg	$-28,6 \pm 20,2$ def*
14	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((4-metoxifenil)amino)benzoico	$2,7 \pm 13,74$ defg	$-11,9 \pm 12,4$ abcd
15	Ácido 2-((3,4-dimetoxifenil)amino)-5-metoxibenzoico	$8,2 \pm 40,1$ cdef	$-9,1 \pm 17,7$ abcd
16	Ácido 3,4-dimetoxi-2-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)benzoico	$13,8 \pm 20,2$ cde	$-11,6 \pm 17,4$ abcd
17	Ácido 2-((3,5-dimetoxifenil)amino)-4,5-dimetoxibenzoico	$16,8 \pm 20,4$ cde	$-4,3 \pm 11,8$ abc
18	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((3-metoxifenil)amino)benzoico	$25,1 \pm 18,0$ bcd	$-13,3 \pm 13,8$ bcd
19	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((2-metoxifenil)amino)benzoico	$38,2 \pm 18,6$ abc*	$0,3 \pm 10,9$ ab
20	Ácido 5-metoxi-2-((4-metoxifenil)amino)benzoico	$39,0 \pm 23,0$ abc*	$-38,1 \pm 18,8$ efgh*
21	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((4-metoxi-2-metilfenil)amino)benzoico	$49,5 \pm 15,3$ ab*	$4,6 \pm 14,1$ a
22	Ácido 4,5-dimetoxi-2-((2-metoxi-4-metilfenil)amino)benzoico	$55,3 \pm 27,7$ ab*	$-6,0 \pm 12,9$ abc
23	Ácido 5-metoxi-2-((2-metoxi-4-metilfenil)amino)benzoico	$68,7 \pm 17,6$ a*	$0,3 \pm 12,4$ ab
Controle veículo	Solução aquosa contendo EtOH (0,50% (v/v))	$2,2 \pm 0,9$ cm	$1,4 \pm 0,2$ cm

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcdefghijk, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas através do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados estão expressos como a diferença percentual média em relação ao controle veículo ($=100\%$) $\pm$ DP.

O mecanismo de ação de derivados sintéticos do antranilato permanece desconhecido; acredita-se, no entanto, que essas substâncias atuem inibindo a antranilato sintase, uma enzima chave na rota biossintética do triptofano via ácido chiquímico, o que leva à interrupção da produção desse aminoácido essencial. Essa interrupção interfere no crescimento e desenvolvimento das plantas, resultando no efeito herbicida (Siehl et al., 1997). No entanto, além de sua capacidade de inibir uma enzima-alvo, outras propriedades podem estar envolvidas no efeito herbicida observado.

Com base nos resultados preliminares da atividade fitotóxica, as substâncias **1**, **2**, **3** e **4** foram selecionadas para uma avaliação mais aprofundada de sua capacidade inibidora de crescimento em *L. sativus*, *R. raphanistrum* e *D. insularis*, utilizando concentrações de 1000, 500 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

1.4.3 Avaliação do potencial fitotóxico de diarilaminas derivadas de ácido antranílico em bioensaio de crescimento inicial

As substâncias **1**, **2**, **3** e **4**, foram submetidas a uma análise detalhada de suas atividades inibitórias no crescimento inicial de *L. sativus* (uma eudicotiledônea), assim como das plantas daninhas *R. raphanistrum* (também eudicotiledônea) e *D. insularis* (uma monocotiledônea). Essa avaliação envolveu a utilização de diferentes concentrações das substâncias, a saber: 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O comprimento da raiz principal e da parte aérea de *L. sativus* foi substancialmente inibido, com taxas de inibição superiores a 70%, quando exposto as substâncias na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 2). No entanto, a substância **4** demonstrou taxas de inibição mais baixas no crescimento da raiz principal e da parte aérea de *L. sativus*. Ademais, a substância **2** exibiu uma forte inibição no crescimento da raiz principal dessa espécie-alvo, atingindo 86% a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, embora tenha permanecido inativo em concentrações mais baixas. Enquanto, a substância **1** demonstrou uma atividade comparável à do glifosato, inibindo o crescimento da raiz principal de *L. sativus* em 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os efeitos das diarilaminas derivadas de ácido antranílico em *R. raphanistrum* (Tabela 3), mostraram que o comprimento da raiz principal e da parte aérea dessa planta daninha foi significativamente inibido pelas substâncias **1**, **2**, **3** e **4** na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com destaque para a substância **2**, que alcançou uma inibição de 81%. Com exceção da substância **3**, todos os derivados sintéticos apresentaram uma inibição significativa no comprimento da raiz principal de *R. raphanistrum* na concentração de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 2. Toxicidade de diarilaminas derivadas de ácido antranílico, substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e glifosato no crescimento inicial de *L. sativa* (alface).

Substância	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
Glifosato	1000	$-66,6 \pm 6,1$ fgh*	$2,4 \pm 37,0$ ab
	500	$-63,5 \pm 6,6$ efg*	$51,9 \pm 47,8$ a*
	100	$-46,1 \pm 9,5$ cdef*	$58,1 \pm 48,0$ a*
1	1000	$-86,3 \pm 4,6$ i*	$-76,2 \pm 0,0$ d*
	500	$-53,7 \pm 23,4$ defg*	$-30,0 \pm 29,8$ bc*
	100	$30,1 \pm 23,5$ ab*	$30,0 \pm 52,5$ a*
2	1000	$-85,6 \pm 1,7$ hi*	$-76,2 \pm 0,0$ d*
	500	$33,6 \pm 28,6$ ab*	$-51,0 \pm 12,2$ c*
	100	$43,3 \pm 46,2$ ab*	$4,3 \pm 26,7$ a
3	1000	$-78,1 \pm 6,0$ ghi*	$-76,2 \pm 0,0$ d*
	500	$-33,7 \pm 17,8$ cd*	$-49,5 \pm 20,2$ c*
	100	$48,5 \pm 23,2$ a*	$9,5 \pm 31,0$ a
4	1000	$-35,3 \pm 14,5$ cde*	$-50,0 \pm 13,8$ c*
	500	$-8,2 \pm 20,1$ bc	$-49,1 \pm 14,4$ c*
	100	$25,6 \pm 22,1$ ab*	$2,9 \pm 28,2$ ab

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcdef, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo ($= 100\%$) $\pm$ DP. Valores absolutos para o controle veículo: comprimento da raiz principal = $2,2 \pm 1,1$ cm e comprimento da parte aérea = $0,4 \pm 0,2$ cm.

No bioensaio realizado, a substância **1** se destacou, apresentando uma fitotoxicidade considerável, com uma inibição de 63% no comprimento da raiz principal de *D. insularis* a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 4). É importante mencionar que as substâncias sintéticas demonstraram uma fitotoxicidade equiparável à do glifosato em relação ao crescimento da raiz principal de *D. insularis*. No entanto, não foram observadas alterações significativas no comprimento da parte aérea de *D. insularis* quando exposto a essas substâncias em nenhuma das concentrações analisadas.

Tabela 3. Toxicidade de diarilaminas derivadas de ácido antranílico, substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e glifosato no crescimento inicial de *R. raphanistrum* (nabiça).

Substância	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
Glifosato	1000	$-52,3 \pm 14,7 \text{ c}^*$	$-18,6 \pm 23,8 \text{ abcd}^*$
	500	$-52,0 \pm 10,8 \text{ c}^*$	$3,0 \pm 24,8 \text{ a}$
	100	$-41,3 \pm 14,0 \text{ bc}^*$	$4,5 \pm 27,6 \text{ a}$
1	1000	$-72,5 \pm 15,5 \text{ de}^*$	$-35,6 \pm 22,0 \text{ def}^*$
	500	$-55,6 \pm 18,1 \text{ cd}^*$	$-37,7 \pm 19,7 \text{ ef}^*$
	100	$-9,7 \pm 29,1 \text{ ab}$	$-20,8 \pm 22,2 \text{ bcde}^*$
2	1000	$-81,3 \pm 8,8 \text{ e}^*$	$-67,6 \pm 16,5 \text{ g}^*$
	500	$-74,1 \pm 16,3 \text{ de}^*$	$-44,1 \pm 24,3 \text{ fg}^*$
	100	$54,6 \pm 37,5 \text{ a}^*$	$-13,7 \pm 28,5 \text{ ab}^*$
3	1000	$-75,4 \pm 18,8 \text{ e}^*$	$-43,7 \pm 17,7 \text{ f}^*$
	500	$-7,2 \pm 32,4 \text{ ab}$	$-15,4 \pm 28,0 \text{ abc}^*$
	100	$24,0 \pm 42,8 \text{ a}^*$	$-11,4 \pm 20,1 \text{ ab}$
4	1000	$-80,1 \pm 7,4 \text{ e}^*$	$-34,6 \pm 17,1 \text{ cdef}^*$
	500	$-55,8 \pm 21,1 \text{ cd}^*$	$-25,4 \pm 21,0 \text{ bcde}^*$
	100	$47,4 \pm 47,3 \text{ a}^*$	$-13,4 \pm 22,9 \text{ ab}^*$

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; abcde, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo ($= 100\%$) $\pm$ DP. Valores absolutos para o controle veículo: comprimento da raiz principal = $3,2 \pm 0,7 \text{ cm}$ e comprimento da parte aérea = $1,5 \pm 0,4 \text{ cm}$.

Vale ressaltar que é comum que substâncias sintéticas exerçam efeitos inibitórios apenas em concentrações mais elevadas, diminuindo ou até mesmo estimulando o crescimento em concentrações mais baixas. Essa tendência foi observada nas substâncias **1**, **2**, **3** e **4** em *L. sativus* (Tabela 2) e nas substâncias **2**, **3** e **4** em *R. raphanistrum* (Tabela 3) quando utilizados em concentrações mais baixas (Macías et al., 2000; Macías et al., 2006).

Tabela 4. Toxicidade de diarilaminas derivadas de ácido antranílico, substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e glifosato no crescimento inicial de *D. insularis* (capim amargoso).

Substância	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comprimento da raiz (%)	Comprimento da parte aérea (%)
Glifosato	1000	$-62,3 \pm 9,9 \text{ c}^*$	$-49,0 \pm 7,1 \text{ b}^*$
	500	$-49,3 \pm 9,9 \text{ b}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	100	$-12,1 \pm 20,6 \text{ a}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
1	1000	$-63,4 \pm 12,6 \text{ c}^*$	$2,0 \pm 22,5 \text{ a}$
	500	$-52,9 \pm 14,1 \text{ bc}^*$	$10,0 \pm 22,6 \text{ a}^*$
	100	$-2,8 \pm 26,1 \text{ a}$	$-2,0 \pm 9,9 \text{ a}$
2	1000	$-62,4 \pm 9,1 \text{ c}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	500	$-56,0 \pm 9,3 \text{ bc}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	100	$-16,2 \pm 30,8 \text{ a}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
3	1000	$-60,4 \pm 11,5 \text{ bc}^*$	$-1,0 \pm 7,1 \text{ a}$
	500	$-52,4 \pm 12,3 \text{ bc}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	100	$-6,9 \pm 27,1 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
4	1000	$-60,4 \pm 10,1 \text{ bc}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	500	$-60,8 \pm 12,7 \text{ bc}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
	100	$-18,3 \pm 28,8 \text{ a}^*$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$

*Diferença significativa entre o controle veículo e o tratamento; ab, indicam diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com valores absolutos. Os dados apresentados representam a diferença percentual média em comparação com o controle veículo ($= 100\%$) $\pm$ DP. Valores absolutos para o controle veículo: comprimento da raiz principal = $1,8 \pm 0,5 \text{ cm}$ e comprimento da parte aérea = $0,2 \pm 0,0 \text{ cm}$.

1.4.4 Avaliação da biodisponibilidade em plantas e predição ADME de diarilaminas derivadas de ácido antranílico

Em termos gerais, as diarilaminas derivadas de ácido antranílico seguem os padrões estruturais observados nos herbicidas comerciais (Tice et al., 2001). Por exemplo, para previsão da biodisponibilidade de pequenas moléculas em plantas, as substâncias sintéticas devem possuir o peso molecular entre 150-500 g/mol, enquanto as diarilaminas derivadas de ácido antranílico apresentam massas molares entre 243,3 e 363,4 g/mol (Tabela S1). A distribuição de átomos aromáticos também apresenta um perfil semelhante tanto nos herbicidas quanto nos derivados sintéticos; 90% dos herbicidas comerciais possuem átomos aromáticos. Além disso, os coeficientes de partição ($\text{LogP} \leq 5$) e o número de ligações com rotação livre ($\text{nRotB} \leq 12$)

das diarilaminas derivadas de ácido antranílico (**1-23**) seguem os padrões estabelecidos pela “regra dos cinco de Tice” (Tice et al., 2001). Portanto, quando comparamos as substâncias sintéticas (Tabela S1) com os padrões estabelecidos pela “regra dos cinco de Tice”, observamos que, em geral, essas substâncias possuem níveis semelhantes de hidrofiliicidade e lipofiliicidade. É importante ressaltar que uma substância ativa contra um alvo *in vitro* pode não apresentar a mesma atividade *in vivo*, muitas vezes devido à dificuldade da molécula em penetrar membranas ou paredes celulares, especialmente quando a substância é altamente hidrofílica, o que pode impedir sua difusão nos compartimentos intracelulares (Gandy et al., 2015). Portanto, é relevante considerar os padrões estruturais e as propriedades de moléculas biologicamente ativas durante o desenvolvimento de novas substâncias.

A avaliação gráfica da absorção intestinal e permeação cerebral foi realizada utilizando o método BOILED-Egg baseado em tPSA/LogP, disponível na ferramenta SwissADME, e é descrita para cada diarilamina derivada de ácido antranílico na Tabela S1. Observou-se que as substâncias sintéticas possuem alta previsão de permeabilidade intestinal (Figura 3 e 4), conforme indicado pela localização da substância dentro da elipse branca que define a absorção intestinal. Os resultados indicam que as substâncias sintéticas são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal humano, aumentando o risco de exposição humana a esses contaminantes ambientais através da ingestão oral. Essa exposição pode resultar em efeitos adversos à saúde, como desregulação endócrina e desenvolvimento de câncer (Mostafalou e Abdollahi, 2017). No entanto, a realização de estudos *in vivo* é essencial para avaliar os verdadeiros impactos das substâncias sintéticas em seres humanos.

A análise da previsão de permeação cerebral revelou que apenas as substâncias **10**, **12**, **16**, **17** e glifosato, não estavam contidas dentro da elipse amarela correspondente às moléculas que permeiam o cérebro (Figuras 3 e 4), sugerindo que essas substâncias não possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e possivelmente não exercem efeitos neurotóxicos (Saeedi e Dehpour, 2016). Destaca-se que todas as substâncias sintéticas com previsão de permeação cerebral também apresentaram uma alta previsão de absorção intestinal. Esse padrão era esperado, considerando que a elipse de permeação cerebral, definida pelo método BOILED-Egg, está essencialmente contida dentro da elipse de permeação intestinal (Figura 3 e 4 e Tabela S1).

Para uma análise mais abrangente, foram comparados os valores de diversos parâmetros físico-químicos entre as substâncias sintéticas com previsão de permeabilidade intestinal e aquelas sem tal previsão. Foi observado que vários parâmetros, como peso molecular (PM), número de átomos pesados, fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), número de

ligações com rotação livre (nRotB), número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), refratividade molar (Rm) e área superficial polar topológica (tPSA), apresentavam diferenças entre as substâncias com e sem previsão de permeação cerebral. As diarilaminas derivadas de ácido antranílico sem previsão de permeação cerebral demonstraram ter valores consideravelmente mais elevados em relação ao peso molecular, número de átomos pesados, fração de saturação de ligações de carbono, número de ligações com rotação livre, número de aceptores de ligação de hidrogênio, refratividade molar e área superficial polar topológica em comparação com suas contrapartes que apresentaram previsão de permeação cerebral (Tabela S1).

No que diz respeito à permeação intestinal, todas as substâncias sintéticas mostraram uma previsão de alta permeabilidade intestinal, sugerindo que a maioria delas é capaz de atravessar a barreira intestinal com facilidade. No entanto, ao contrário do que foi observado com a previsão de permeação cerebral, não foi possível estabelecer uma relação clara entre os parâmetros físico-químicos e a permeabilidade intestinal das substâncias sintéticas, como evidenciado na Tabela S1.

Destaca-se que, métodos computacionais que utilizam os descritores moleculares, como lipofilicidade e polaridade, originalmente desenvolvidos para medicamentos (Cheng et al., 2013; Chedik et al., 2017), podem ser valiosos na previsão da permeação intestinal e cerebral de potenciais herbicidas. No entanto, para garantir a eficácia e a segurança dessas previsões, é essencial conduzir estudos adicionais que validem essas abordagens *in silico*. Estes estudos devem considerar as condições reais de exposição ambiental aos herbicidas, incluindo doses baixas e/ou crônicas de misturas de pesticidas. Essa validação é crucial para assegurar uma avaliação precisa do risco associado ao uso dessas substâncias, bem como para promover medidas adequadas de proteção à saúde pública e ambiental.

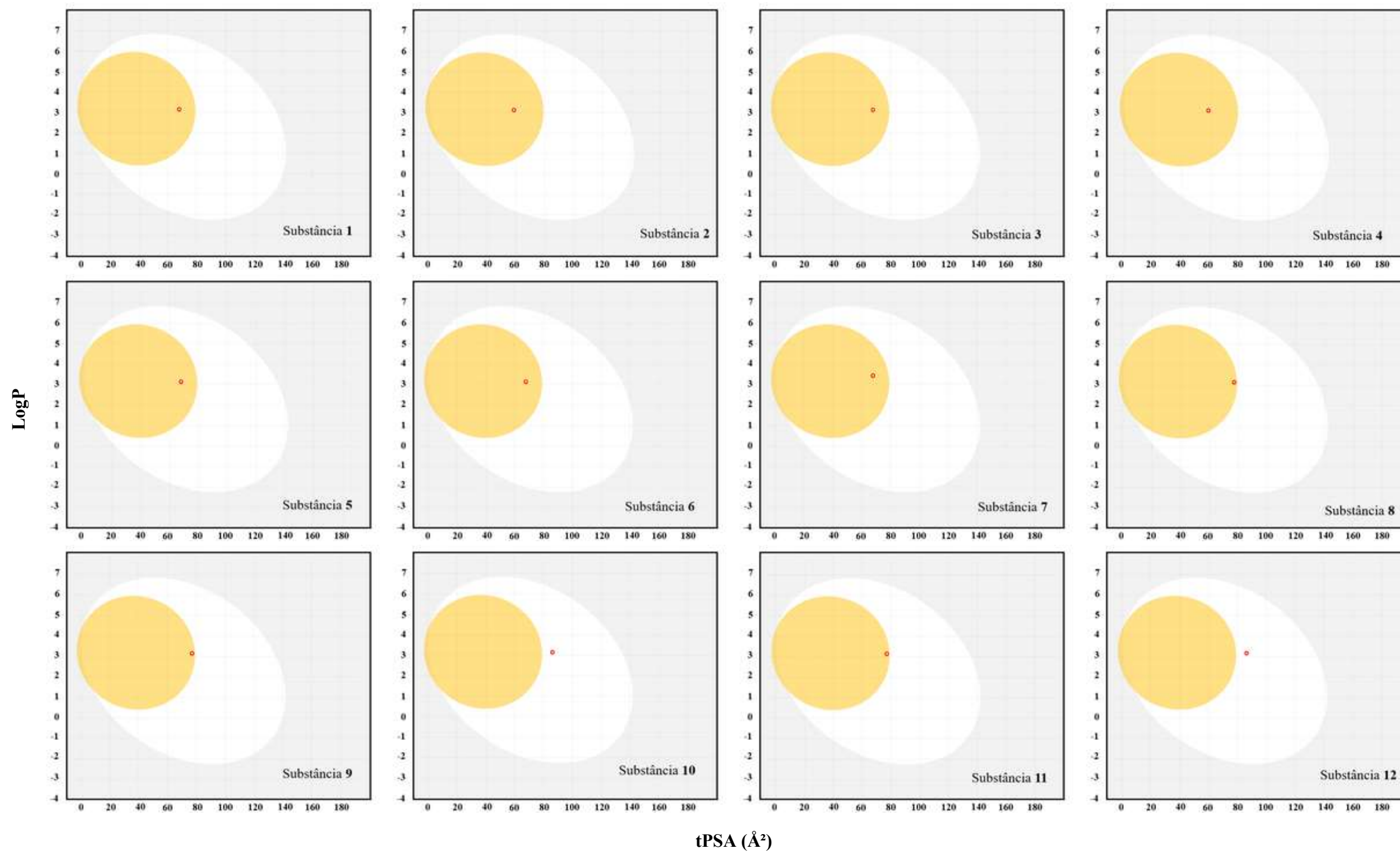
1.4.5 Avaliação da ecotoxicidade em zooplâncton

Herbicidas utilizados no controle de plantas daninhas, embora eficazes, podem contaminar corpos d'água, devido à deriva da pulverização, escoamento e pulverização direta (Peterson et al., 1994). Portanto, é essencial avaliar os efeitos tóxicos que esses agroquímicos podem ter em organismos não alvo no ambiente aquático. Organismos zooplancônicos são frequentemente utilizados como bioindicadores da qualidade da água, principalmente devido à sua posição intermediária na cadeia alimentar, atuando como elo entre os produtores primários

(fitoplâncton) e os consumidores de níveis superiores (peixes) (Kasai e Hanazato, 1995; Neves et al., 2015).

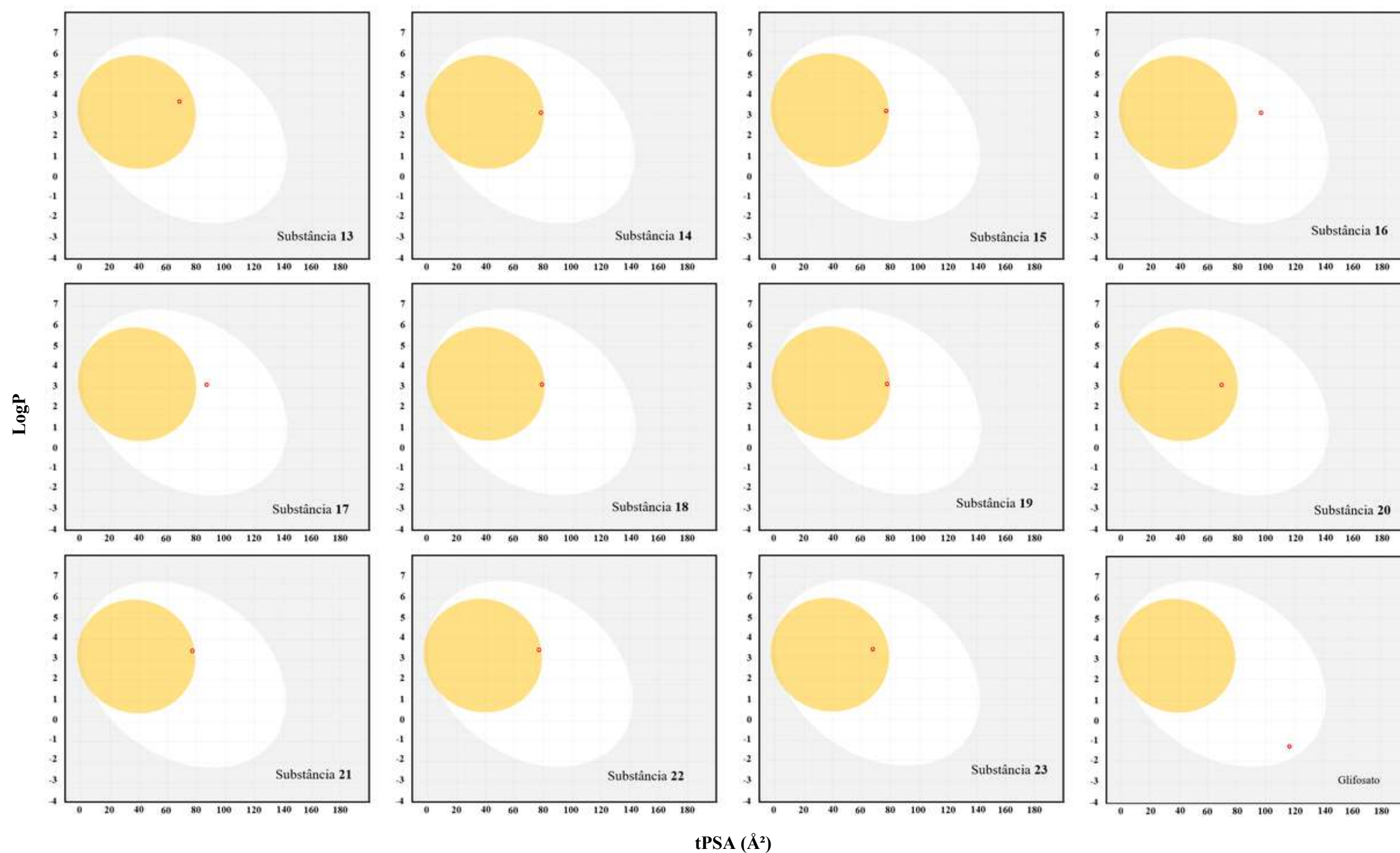
Os efeitos das diarilaminas derivadas de ácido antranílico (substâncias **1**, **2**, **3** e **4**) e glifosato na emergência de zooplâncton, a partir do sedimento de um lago, foram avaliados em uma concentração de 0,28 mg L⁻¹ e estão representados na Figura 5. Embora os tratamentos tenham registrado maiores emergências totais de zooplânctons em relação ao grupo controle, exceto para a substância 1 e glifosato em relação à riqueza de táxons de zooplâncton, e das substâncias 1 e 3 em relação à abundância de zooplâncton, observamos que tanto o glifosato (Roundup®) quanto as diarilaminas derivadas de ácido antranílico (substâncias **1**, **2**, **3** e **4**) não exercem uma influência significativa na riqueza e abundância total de zooplâncton quando comparados ao grupo de controle.

Figura 3. Distribuição gráfica das diarilaminas derivadas de ácido antranílico (1-12) utilizando o modelo preditivo BOILED-Egg para permeação intestinal e cerebral.



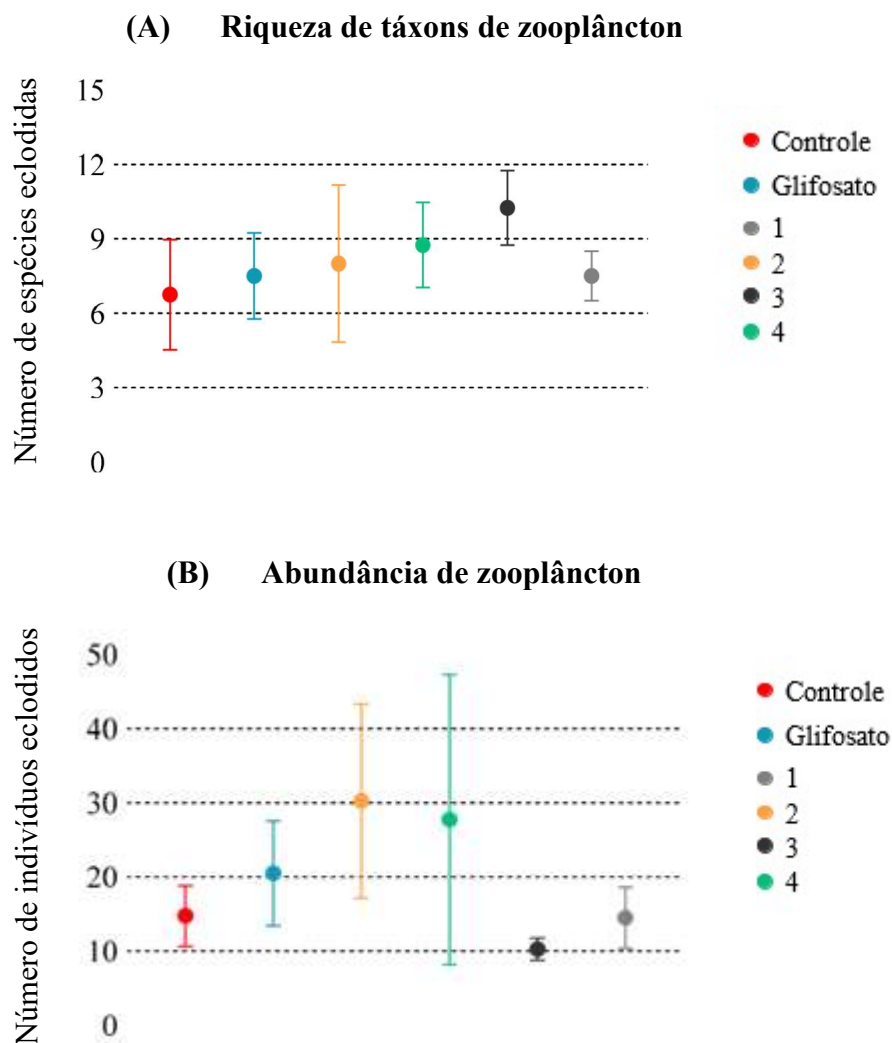
Cada substância sintética corresponde a um pequeno círculo vermelho. A região branca representa o espaço físico-químico previsto para alta absorção intestinal demonstrada pelas substâncias, enquanto a região amarela indica a previsão de permeabilidade cerebral. Os parâmetros tPSA (área de superfície polar topológica) e LogP (valor de LogP calculado segundo o método Wildman-Crippen) são usados na análise.

Figura 4. Distribuição gráfica das diarilaminas derivadas de ácido antranílico (**13-23**) e glifosato (N-(fosfonometil)glicina) utilizando o modelo preditivo BOILED-Egg para permeação intestinal e cerebral.



*Cada substância sintética corresponde a um pequeno círculo vermelho. A região branca representa o espaço físico-químico previsto para alta absorção intestinal demonstrada pelas substâncias, enquanto a região amarela indica a previsão de permeabilidade cerebral. Os parâmetros tPSA (área de superfície polar topológica) e LogP (valor de LogP calculado segundo o método Wildman-Crippen) são usados na análise.

Figura 5. Efeitos de diarilaminas derivadas de ácido antranílico na emergência de zooplâncton.



*(A) Número de espécies eclodidas, (B) Número de indivíduos eclodidos. Os dados apresentados representam a médias $\pm$ DP.

1.5 Conclusão

Este estudo demonstrou a fitotoxicidade de diarilaminas derivadas de ácido antranílico no crescimento inicial de *L. sativa* e das plantas daninhas *R. raphanistrum* e *D. insularis*. Os resultados revelam que as substâncias 2-((3,4-dimetoxifenil)amino)benzoico, ácido 2-((4-metoxifenil)amino)benzoico, ácido 2-((3,5-dimetoxifenil)amino)benzoico e ácido 2-((3-metoxifenil)amino)benzoico apresentam significativa capacidade de inibir o crescimento inicial das espécies-alvo. Ressalta-se que as substâncias ácido 2-((3,4-dimetoxifenil)amino)-4,5-dimetoxibenzoico, ácido 5-metoxi-2-((3,4,5-trimetoxi-fenil)amino)benzoico, ácido 3,4-dimetoxi-2-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)benzoico e ácido 2-((3,5-dimetoxifenil)amino)-4,5-dimetoxibenzoico não apresentaram capacidade de atravessar a barreira cerebral em análise *in*

silico. A análise das propriedades físico-químicas das diarilaminas derivadas de ácido antranílico revelou a similaridade estrutural das substâncias sintéticas com herbicidas comerciais. Além disso, ao avaliar os efeitos desses derivados sintéticos em organismos zooplancônicos, observamos que as diarilaminas derivadas de ácido antranílico não influenciam significativamente na riqueza e abundância total de zooplâncton. No entanto, a importância de estudos adicionais para validar essas descobertas em diferentes contextos ambientais e em diversas espécies vegetais, a fim de compreender melhor os mecanismos subjacentes à atividade dessas substâncias, é enfatizado.

1.6 Referências

- BAUCOM, R. S. e HOLT, J. S., 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed Science. *New Phytologist*, vol. 184, n. 4, pp. 741–743.
- BORELLA, J. e PASTORINI, L.H., 2010. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 34, no. 5, pp. 1129-1135.
- BROCK, M.A., NIELSEN, D.L. e CROSSLÉ, K., 2005. Changes in biotic communities developing from freshwater wetland sediments under experimental salinity and water regimes. *Freshwater Biology*, vol. 50, pp. 1376-1390.
- CHEDIK, L., MIAS-LUCQUIN, D., BRUYERE, A. e FARDEL, O., 2017. *In Silico* Prediction for Intestinal Absorption and Brain Penetration of Chemical Pesticides in Humans. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 14, n. 7, pp. 708.
- CHENG, F., LI, W., LIU, G. e TANG, Y., 2013. *In silico* ADMET prediction: Recent advances, current challenges and future trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 13, pp. 1273–1289.
- CHUNG, I.M., AHN, J.K. e YUN, S.J., 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, vol. 20, pp. 921-928.
- DAINA, A. e ZOETE V.A, 2016. BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, vol. 11, n. 11, pp. 1117-21.
- DAINA, A., MICHELIN, O. e ZOETE, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, n. 7, pp. 42717.
- DAYAN, F.E., 2019. Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, vol. 8, n. 9, pp. 341.

DAYAN, F.E., CANTRELL, C.L. e DUKE, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, n. 12, pp. 4022–4034.

DAYAN, F.E. e DUKE, S.O., 2014. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant Physiology*, vol. 166, n. 3, pp. 1090–1105.

DUKE, S.O., ROMAGNI, J.G. e DAYAN, F.E., 2000. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, vol. 19, pp. 583–589.

DUKE, S.O. e DAYAN, F.E., 2022. *Herbicides*. John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).

FERREIRA, A.G. e AQUILA, M.E.A., 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista brasileira de fisiologia vegetal*, vol. 12, pp. 175–204.

GANDY, M.N., CORRAL, M.G., MYLNE, J.S. e STUBBS, K.A., 2015. An interactive database to explore herbicide physicochemical properties. *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 13, pp. 5586–5590.

GAZZIERO, D.L.P., LOLLATO, R.P., BRIGHENTI, A.M., PITELLI, R.A. e VOLL, E., 2015. *Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja*. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja. 126 p.

GIANESSI, L.P., 2013. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Management Science*, vol. 69, n. 10, pp. 1099–1105.

GRANADO, D.C. e HENRY, R., 2008. The influence of the hydrologic pulse on the water physical and chemical variables of lateral lakes with different connection levels to Paranapanema Rivers in the mouth zone at Jurumirim Reservoir (São Paulo – Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 20, pp. 265–275.

IGLESIAS, C., BONECKER, C., BRANDÃO, L., CRISPIM, M.C., ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M., GERHARD, M., PORTINHO, J. L., MAIA-BARBOSA, P., PANARELLI, E. e SANTANGELO, J.M., 2016. Current knowledge of South American cladocerans diapause: a brief review. *International Review of Hydrobiology*, vol. 101, pp. 91–104.

KASAI, F. e HANAZATO, T., 1995. Effects of the triazine herbicide, simetryn, on freshwater plankton communities in experimental ponds. *Environmental Pollution*, vol. 89, pp. 197–202.

LI, J. e LAST, R.L., 1996. The *Arabidopsis thaliana* trp5 mutant has a feedback-resistant anthranilate synthase and elevated soluble tryptophan. *Plant Physiology*, vol. 110, n. 1, pp. 51–59.

MACÍAS, F.A., CASTELLANO, D. e MOLINILLO, J.M.G., 2000. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. 48, pp. 2512–2521.

MACÍAS, F.A., FERNÁNDEZ, A., VARELA, R.M., MOLINILLO, J.M.G., TORRES, A. e ALVES, P.L.C.A., 2006. Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. *Journal of Natural Products*, vol. 69, pp. 795–800.

MOSTAFALOU, S. e ABDOLLAHI, M., 2017. Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Archives Toxicology*, vol. 91, pp. 549–599.

NEVES, M., CASTRO, B.B., VIDAL, T., VIEIRA, R., MARQUES, J.C., COUTINHO, J.A.P., GONÇALVES, F. e GONÇALVES, A.M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological Indicators*, vol. 53, pp. 220-230.

NIELSEN, D.L., BROCK, M.A., CROSSLÉ, K., HARRIS, K., HEALEY, M. e JAROSINSKI, I., 2003. The effects of salinity on aquatic plant germination and zooplankton hatching from two wetland sediments. *Freshwater Biology*, vol. 48, pp. 2214-2223.

NIELSEN, D.L., BROCK, M.A., PETRIE, R. e CROSSLÉ, K., 2007. The impact of salinity pulses on the emergence of plant and zooplankton from wetland seed and egg banks. *Freshwater Biology*, vol. 52, pp. 784-795.

PANARELLI, E.A., CASANOVA, S.M.C. e HENRY, R., 2008. The role of resting eggs in the recovery of zooplankton community in a marginal lake of the Paranapanema River (São Paulo, Brazil), after a long drought period. *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 20, pp. 73-88.

PETERSON, H.G., BOUTIN, C., MARTIN, P.A., FREEMARK, K.E., RUECKER, N.J. e MOODY, M.J., 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, vol. 28, pp. 275-292.

PORTINHO, J.L., NIELSEN, D.L., NING, N., PAUL, W. e NOGUEIRA, M.G., 2016. Spatial variability of aquatic plant and microfaunal seed and egg bank communities within a forested floodplain system of a temperate Australian river. *Aquatic Sciences*, vol. 79, pp. 515-527.

QU, R.-Y., HE, B., YANG, J.-F., LIN, H.-Y., YANG, W.-C., WU, Q.-Y., LI, Q. X. e YANG, G.-F., 2021. Where are the new herbicides?. *Pest Management Science*, vol. 77, n. 6, pp. 2620–2625.

RESOLUÇÃO CONAMA, 2005 [visualizado em 23 de Agosto 2023]. Diário Oficial da União. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>.

ROIREAU, J. H., ROSANO, R. J., LAZZARA, N. C., CHEN, T., BAJSA-HIRSCHER, J., SCHRADER, K. K., DUKE, S. O., WYKOFF, D. e GIULIANO, R. M., 2020. Synthesis of pyranopyrans related to diplopyrone and evaluation as antibacterials and herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, n. 37, pp. 9906–9916.

SAEEDI SARAVI, S.S. e DEHPOUR, A.R., 2016. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sciences*, vol. 145, pp. 255–264.

SIEHL, D. L., SUBRAMANIAN, M. V., WALTERS, W., BLANDING, J. H., NIDERMAN, T. e WEINMANN, C., 1997. Evaluating anthranilate synthase as a herbicide target. *Weed Science*, vol. 45, pp. 628-633.

SOUZA FILHO, A.P.S., RODRIGUES, L.R.A. e RODRIGUES, T.S., 1996. Efeitos de extratos aquosos de assa-Peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. *Planta Daninha*, vol. 14, no. 2, pp. 93–101.

THOMAS, G. J., 1984. Herbicidal activity of 6-methylanthranilic acid and analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 32, pp. 747-749.

TICE, C.M., 2001. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals?. *Pest Management Science*, vol. 57, no. 1, pp. 3-16.

VYVYAN, J. R., 2022. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, vol. 58, pp. 1631–1646.

WILMS, W., WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M., SYGUDA, A., NIEMCZAK, M., ŁAWNICZAK, Ł., PERNAK, J., ROGERS, R. D. e CHRZANOWSKI, Ł., 2020. Herbicidal ionic liquids: a promising future for old herbicides? review on synthesis, toxicity, biodegradation, and efficacy studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, n. 39, pp. 10456–10488.

ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. 5th ed. New Jersey.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Parâmetros físico-químicos das diarilaminas derivadas de ácido antranílico obtidos através do preditor SwissADME.

Substância	Notação SMILES	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Número de átomos pesados	Número de átomos pesados aromáticos	Csp3	nRotB	HBA	HBD	Rm	tPSA (Å²)	LogP	LogS	Permeação intestinal	Permeação cerebral
1	COC1=CC(OC)=CC(NC2=C(C=CC=C2)C(O)=O)=C1	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,3	20	12	0,1	5	4	2	75,9	67,8	4,5	-4,6	Alta	Sim
2	COC1CCCC(C1)NC1CCCCC1C(=O)O	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,3	18	12	0,1	4	3	2	69,4	58,6	4,6	-4,5	Alta	Sim
3	COC1CC(CCC1OC)NC1CCCCC1C(=O)O	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,3	20	12	0,1	5	4	2	75,9	67,8	4,5	-4,6	Alta	Sim
4	COC1CCC(CC1)NC1CCCCC1C(=O)O	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,3	18	12	0,1	4	3	2	69,4	58,6	4,3	-4,5	Alta	Sim
5	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CCCCC1OC	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,3	20	12	0,1	5	4	2	75,9	67,8	4,5	-4,6	Alta	Sim
6	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CCCC(C1)OC	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,3	20	12	0,1	5	4	2	75,9	67,8	4,5	-4,6	Alta	Sim
7	COC1CCC(C(C1)C)NC1CCC(CC1C(=O)O)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,3	21	12	0,2	5	4	2	80,9	67,8	3,9	-5,0	Alta	Sim
8	COC1CC(CC(C1OC)OC)NC1CCCCC1C(=O)O	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
9	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CC(OC)CC(C1)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	3,7	-4,7	Alta	Sim
10	COC1CC(CCC1OC)NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₇ H ₁₉ NO ₆	333,3	24	12	0,2	7	6	2	88,9	86,3	4,5	-4,8	Alta	Não
11	COC1CCCC(C1)NC1C(CCC(C1OC)OC)C(=O)O	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
12	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CC(OC)C(C(C1)OC)OC	C ₁₇ H ₁₉ NO ₆	333,3	24	12	0,2	7	6	2	88,9	86,3	4,5	-4,8	Alta	Não
13	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CCC(C(C1)F)OC	C ₁₅ H ₁₄ FNO ₄	291,3	21	12	0,1	5	5	2	75,9	67,8	4,6	-4,9	Alta	Sim
14	COC1CCC(CC1)NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
15	COC1CCC(C(C1)C(=O)O)NC1CCC(C(C1)OC)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
16	COC1C(OC)CCC(C1NC1CC(OC)C(C(C1)OC)OC)C(=O)O	C ₁₈ H ₂₁ NO ₇	363,4	26	12	0,3	8	7	2	95,4	95,5	3,4	-4,9	Alta	Não
17	COC1CC(OC)CC(C1)NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₇ H ₁₉ NO ₆	333,3	24	12	0,2	7	6	2	88,9	86,3	3,4	-4,8	Alta	Não
18	COC1CCCC(C1)NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
19	COC1CC(NC2CCCCC2OC)C(CC1OC)C(=O)O	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303,3	22	12	0,2	6	5	2	82,4	77,0	4,5	-4,7	Alta	Sim
20	COC1CCC(CC1)NC1CCC(CC1C(=O)O)OC	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,3	20	12	0,1	5	4	2	75,9	67,8	3,7	-4,6	Alta	Sim
21	COC1CCC(C(C1)C)NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,3	23	12	0,2	6	5	2	87,4	77,0	3,8	-5,1	Alta	Sim
22	COC1CC(C)CCC1NC1CC(OC)C(CC1C(=O)O)OC	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,3	23	12	0,2	6	5	2	87,4	77,0	3,8	-5,1	Alta	Sim
23	COC1CC(C)CCC1NC1CCC(CC1C(=O)O)OC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,3	21	12	0,2	5	4	2	80,9	67,8	3,9	-5,0	Alta	Sim
Glifosato	OC(=O)CNP(=O)(O)O	C ₂ H ₆ NO ₅ P	155,1	9	0	0,5	3	6	4	27,3	116,7	-1,3	1,4	Alta	Não

*Peso molecular (PM), fração de saturação de ligações de carbono (Csp3), número de ligações com rotação livre (nRotB), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), refratividade molar (Rm), polaridade (tPSA), lipofilicidade (LogP) e solubilidade (LogS).

CONCLUSÃO GERAL

O manejo sustentável de plantas daninhas na agricultura é de extrema importância, especialmente quando se considera o aumento previsto na população global. O crescimento populacional previsto representa um desafio significativo para a consecução dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 2) da ONU, que tem como meta eliminar a fome global e promover a sustentabilidade a longo prazo na agricultura. A agricultura sustentável desempenha um papel vital na busca por atender às crescentes necessidades alimentares da população, reduzindo simultaneamente os impactos ambientais e mantendo a produtividade.

O controle de plantas daninhas assume uma relevância essencial na gestão integrada da agricultura, em virtude dos graves danos que podem causar às culturas agrícolas. Embora os herbicidas sintéticos sejam frequentemente utilizados para enfrentar esse desafio, seu uso em larga escala pode acarretar problemas de degradação do solo, poluição ambiental e resistência das plantas daninhas. Portanto, há uma necessidade premente de desenvolver novas classes de herbicidas com novos mecanismos de ação, a fim de reduzir a dependência dos herbicidas atualmente disponíveis no mercado.

Nesse contexto, os bioherbicidas, que se fundamentam em substâncias naturais ou em seus metabólitos especializados, emergem como uma alternativa promissora e ambientalmente amigável para o controle de plantas daninhas. Assim, os resultados apresentados na presente tese destacam o potencial herbicida tanto de substâncias naturais quanto de substâncias sintéticas inspiradas em substâncias naturais.

No primeiro capítulo, a avaliação dos extratos orgânicos provenientes de cinco espécies de plantas medicinais revelou um efeito fitotóxico significativo, principalmente na inibição do desenvolvimento das raízes de plântulas de pepino. As maiores taxas de fitotoxicidade foram observadas nos extratos de metanol de *B. intermedia*, *M. polymorphum*, *L. candicans* e *Q. cordata*, bem como no extrato de hexano de *M. chamissois*. Além disso, a análise química desses extratos abriu portas para a futura identificação e purificação das substâncias ativas responsáveis pelos efeitos fitotóxicos.

No segundo capítulo, a avaliação do potencial herbicida de substâncias sintéticas inspiradas em substâncias naturais, chalconas e curcuminoides, revelou uma variabilidade em seus efeitos, incluindo tanto a estimulação do crescimento radicular quanto uma inibição, especialmente na parte aérea de alface. A estrutura química desempenhou um papel crucial nessa variabilidade, com grupos como nitrofenil, metoxifenil e clorofenil frequentemente associados a efeitos mais pronunciados. No entanto, também foram identificadas substâncias

que não seguiram esse padrão, sublinhando a complexidade das interações metabólicas envolvidas. A conformidade com os parâmetros físico-químicos propostos para herbicidas, embora em sua maioria atendida, não se correlacionou claramente com a atividade biológica, sugerindo a influência de outros fatores. No que tange à permeabilidade intestinal e cerebral prevista, estudos *in vivo* precisam ser realizados para compreendermos completamente os efeitos dessas substâncias em seres humanos.

No terceiro capítulo, as diarilaminas derivadas de ácido antranílico demonstraram atividades inibitórias significativas no crescimento inicial de plântulas de alface e das ervas daninhas (nabiça e capim amargoso). Os resultados destacaram a influência das posições dos grupos substituintes nos anéis A e B dessas substâncias na atividade biológica, bem como a importância de considerar as propriedades físico-químicas, estruturais e toxicológicas na busca por novas substâncias bioativas. Além disso, os ensaios de ecotoxicidade em zooplâncton não indicaram impactos adversos significativos, sugerindo a segurança ambiental dessas substâncias.

Portanto, os resultados obtidos na presente tese oferecem uma perspectiva promissora para a descoberta de herbicidas mais sustentáveis e ambientalmente amigáveis, contribuindo para a gestão eficaz das plantas daninhas na agricultura, ao mesmo tempo em que se alinham com os objetivos de sustentabilidade e segurança alimentar global.

REFERÊNCIAS

- AMALI JESUDAS, P., JAYASURYA KINGSLEY, S. e IGNACIMUTHU, S., 2014. Sorgoleone from *Sorghum bicolor* as a potent bioherbicide. *Research Journal of Recent Sciences*, vol. 3, pp. 32-36.
- BERTIN, C., YANG, X. e WESTON, L.A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, vol. 256, pp. 67-83.
- DAYAN, F. E., WEETE, J. C., DUKE, S. O. e HANCOCK, H. G., 1997. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. *Weed Science*, vol. 45, no. 5, pp. 634-641.
- DUKE, S.O., 2015. Proving allelopathy in crop-weed interactions. *Weed Science*, vol. 63, pp. 121-132.
- DUKE, S.O., 2007. The emergence of grass root chemical ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 43, pp. 16729-16730.
- GHARDE, Y., SINGH, P.K., DUBEY, R. P. e GUPTA, P.K., 2018. Assessment of yield and economic losses in agriculture due to weeds in India. *Crop Protection*, vol. 107, pp. 12-18.
- GŁĄB, L., SOWIŃSKI, J., BOUGH, R. e DAYAN, F.E., 2017. Allelopathic potential of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in weed control: a comprehensive review. In: D. L. SPARKS, ed. *Advances in agronomy*, vol. 145. Academic Press: Cambridge, pp. 43-95.
- GUO, L., QIU, J., LI, L.F., LU, B., OLSEN, K. e FAN, L., 2018. Genomic clues for crop-weed interactions and Evolution. *Trends in Plant Science*, vol. 23, no. 12, pp. 1102-1115.
- HERNANDEZ-TENORIO, F., MIRANDA, A.M., RODRÍGUEZ, C.A., GIRALDO-ESTRADA, C. e SÁEZ, A.A., 2022. Potential strategies in the biopesticide formulations: a bibliometric analysis. *Agronomy*, vol. 12, no. 11, pp. 2665.
- JABRAN, K., MAHAJAN, G., SARDANA, V. e CHAUHAN, B.S., 2015. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, vol. 72, pp. 57-65.
- KHURSHEED, A., RATHER, M.A., JAIN, V., WANI, A.R., RASOOL, S., NAZIR, R., MALIK, N.A. e MAJID, S.A., 2022. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: a comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial Pathogenesis*, vol. 173, pp. 105854.
- LYKOGIANNI, M., BEMPELOU, E., KARAMAOUNA, F. e ALIFERIS, K.A., 2021. Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. *Science of the Total Environment*, vol. 795, pp. 148625.
- MÖHRING, N. e FINGER, R., 2022. Pesticide-free but not organic: adoption of a large-scale wheat production standard in Switzerland. *Food Policy*, vol. 106, pp. 102188.

MOTMAINNA, M., JURAIMI, A.S.B., UDDIN, M.K., ASIB, N.B., ISLAM, A.K.M.M. e HASAN, M., 2021. Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: a review. *Allelopathy Journal*, vol. 52, no. 1, pp. 21-40.

OECD/FAO (2022): OECD-FAO Agricultural Outlook 2022– 2031. OECD Publishing, Paris. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0308en>. Acesso em: 17 jul. 2023.

RICE, E.L., 1985. Allelopathy — An Overview. In: G.A. COOPER-DRIVER, T. SWAIN, E.E. CONN, eds. *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms. Recent Advances in Phytochemistry*, vol. 19. Springer: Boston, pp. 81-105.

SCAVO, A., RESTUCCIA, A. e MAUROMICALE, G., 2018. Allelopathy: principles and basic aspects for agroecosystem control. In: S. GABA, B. SMITH, E. LICHTFOUSE, eds. *Sustainable Agriculture Reviews*, vol. 28. Springer: Cham, pp. 47–101.

SCAVO, A. e MAUROMICALE, G., 2021. Crop allelopathy for sustainable weed management in agroecosystems: knowing the present with a view to the future. *Agronomy*, vol. 11, no. 11, pp. 2104.

SOLTYS, D., KRASUSKA, U., BOGATEK, R. e GNIAZDOW, A., 2013. Allelochemicals as bioherbicides - present and perspectives. In: A. PRICE, J. KELTON, eds. *Herbicides - Current research and case studies in use*. London: IntechOpen, pp. 517-542.