

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

EZEQUIAS DOS SANTOS TORRES

ESTUDO DA FITOTOXICIDADE DA EMODINA

Maringá
2021

EZEQUIAS DOS SANTOS TORRES

ESTUDO DA FITOTOXICIDADE DA EMODINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Rogério Marchiosi

Maringá
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

T693e Torres, Ezequias dos Santos
Estudo da fitotoxicidade da emodina / Ezequias dos Santos Torres. -- Maringá, PR, 2021.
47 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

1. Emodina. 2. Antroquinona. 3. Soja - Fitotoxicidade. 4. Soja - Crescimento. I. Marchiosi, Rogério, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 581

EZEQUIAS DOS SANTOS TORRES

Estudo da fitotoxicidade da emodina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 30 / 09 / 2021

Prof. Dr. Rogério Marchiosi
UEM

Profa. Dra. Marcela de Paiva Foletto-Felipe
UTFPR / Dois Vizinhos

Dra. Josielle Abrahão de Souza
UEM / PBC

BIOGRAFIA

Paraense, nascido na cidade de Santarém, no dia 17 de setembro de 1995, filho do paulista Elias Paulo Torres, e da maranhense Expedita dos Santos Torres, o também violinista Ezequias dos Santos Torres morou em outras duas cidades interioranas, Itaituba e Rurópolis, até realmente ir residir em Santarém no ano de 2011. Lá, formou-se bacharel, primeiro em Ciências Agrárias, finalizado em 2017, depois em Biotecnologia, finalizado em 2018, ambos títulos conquistados pela Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

No ano seguinte à última formação, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PBC, com área de concentração em Biologia Celular e Molecular, na Universidade Estadual de Maringá - UEM, Paraná. Para esta instituição agora apresenta esta dissertação, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, por ser minha forte rocha, além de lâmpada para os meus pés, e luz para os meus caminhos. Sem Ti, ó Pai, nada seria.

Aos meus pais: Elias Paulo Torres e Expedita dos Santos Torres. Grato pelo amor, carinho, e esforço inabalável para me proporcionar todas as oportunidades que tive. Embora nenhum deles tenha entrado em uma instituição de ensino superior, a história dos dois é meu maior exemplo de garra, determinação e trabalho.

Aos meus irmãos, Everton Tiago dos Santos Torres e Paulo Henrique dos Santos Torres, mais velho e mais novo, respectivamente. Ambos me ensinaram muito sobre amor e companheirismo, mesmo tendo relações completamente diferentes com eles. Espero que eu seja um irmão tão bom a vocês, como são para mim.

À Josely dos Santos Carvalho, a tia Josy, por todo o amor e cuidado da vida inteira, e que nessa jornada do mestrado, foi ainda mais valiosa e reforçou o vínculo que vem de berço. Ao Aparecido Müllerchen Kresse de Carvalho da Silva, o tio brasileiro mais alemão que tenho, pelas conversas, filmes, churrascos (vegetarianos) e karaokês. Grato também aos filhos deles, André e Lara Carvalho, pela relação maravilhosa que construímos e consolidamos.

Aos amigos que fiz na graduação, os mais “Iridescentes” amigos que poderia sonhar em ter. Obrigado por estarem comigo, mesmo fisicamente distantes. E também à Thais Aguiar, pela amizade, carinho, e por todos os carimbós dançados juntos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rogério Marchiosi, quem me aceitou como orientando mesmo numa situação não tão propícia, e que mesmo com uma pandemia, mostrou-se um exemplo de professor, orientador e pesquisador. Admiro demais.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Plantas – BioPlan, que me acolheram e me fizeram sentir estar em casa, e não só por passar horas e horas em feriados e fim de semana lá. Em especial, ao Guilherme Almeida, que me ensinou a fazer algo que sem dúvida nenhuma me sinto mestre nisso: colocar sementes de soja para germinar em papel; à Aline Marengoni e à Danielly Martarello, pelas conversas, dicas e paciência em me ensinar tantas técnicas novas, e também por me ensinarem um novo conceito em “rato de laboratório”, vocês são grandes pesquisadoras; ao Luiz Grizza, por tantas madrugadas de conversas despreziosas mas intensas enquanto observarmos o IRGA fazer seus milagres.

Aos também colegas de Lab, mas que rapidamente saltaram para amigos de vida: Breno Joia, um dos caras mais gentis e inteligentes que conheci; Karla Gabriela Manzatti, uma pessoa que Nando Reis aproximou e que se mostrou uma amiga incrível e uma pesquisadora de mão cheia; e Rafaela Andreza, um ser de luz, que tive o privilégio de conhecer e chamar de amiga, a revolução nos aguarda, mestra da escrita (rsrs).

À Jaqueline Uber, Cler Jansen e Renata Rodrigues, mulheres maravilhosas nas suas singularidades, pesquisadoras notáveis e amigas que carrego no peito.

Finalmente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não seria possível. Assim como à Universidade Estadual de Maringá- UEM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PBC.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado é composta por uma parte introdutória, contendo uma biografia curta do autor, agradecimentos, um resumo geral (escrito em português e inglês) além de dois capítulos em formato de artigo científico.

O primeiro capítulo/artigo é uma revisão sobre os aspectos bioquímicos da emodina com foco nas ações em plantas. Ele deve ser submetido à revista *Phytochemistry Reviews*, cujo fator de impacto é 5.374, e por isso foi escrito seguindo as normas da revista.

O segundo capítulo/artigo é um trabalho original, com dados coletados durante o mestrado, e que deve ser submetido à revista *Plant Physiology and Biochemistry*, que possui fator de impacto de 4.27. O modelo de escrita foi de acordo com as normas desta revista.

Ambos capítulos, apesar do formato em linhas gerais serem escritos segundo as normas da revista a serem submetidos, os dois foram adaptados para facilitar a avaliação da dissertação.

RESUMO GERAL

A emodina é um metabólito secundário predominante em diversas espécies de ervas asiáticas das famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae, as quais são empregadas na medicina tradicional da região há mais de 2.000 anos. Dentre seus vários usos e atuais aplicações a emodina se destaca por suas ações anti-inflamatória, antioxidante, laxativa, antitumoral e alelopática. Como não há revisões recentes sobre esta antraquinona, o primeiro capítulo desta dissertação consiste em um levantamento bibliográfico detalhado sobre as ações da emodina em plantas, considerando aspectos práticos tais como solubilidade, papel ecológico e perspectivas de aplicação nos mais diversos campos da ciência, tais como saúde humana e agricultura. O segundo capítulo consiste em um artigo original que explora a fitotoxicidade da emodina sobre crescimento e metabolismo antioxidante de soja. Duas estratégias de exposição foram utilizadas: exposições de curto (72 h) e médio prazo (15 dias). De modo geral, a exposição de curto prazo demonstrou que a emodina pode estimular discretamente o crescimento das plantas de soja, bem como a atividade de enzimas do sistema antioxidante. Em contraste, a exposição de médio prazo revelou a fitotoxicidade da emodina para a soja na forma de inibição do crescimento. Conclui-se, portanto, que a emodina possui atividade herbicida e antioxidante, dependendo do tempo que as plantas são expostas à ela.

PALAVRAS-CHAVE: emodina, funções metabólicas, fitotoxicidade, mecanismo de ação, soja.

ABSTRACT

Emodin is a predominant secondary metabolite in several Asian herb species of the Fabaceae, Polygonaceae and Rhamnaceae families, which have been used in traditional medicine in the region for more than 2,000 years. Among its various uses and current applications, emodin stands out for its anti-inflammatory, antioxidant, laxative, antitumor and allelopathic properties. As there are no recent reviews about this anthraquinone, the first chapter of this dissertation consists of a detailed bibliographical survey on the actions of emodin in plants, considering practical aspects such as solubility, ecological role and perspectives of application in the most diverse fields of science, such as human health and agriculture. The second chapter consists of an original article that explores the phytotoxicity of emodin on growth and antioxidant metabolism of soybean. Two exposure strategies were used: short (72 h) and medium-term (15 days) exposures. Overall, short-term exposure demonstrated that emodin can discretely stimulate the growth of soybean plants, as well as the activity of enzymes of the antioxidant system. In contrast, medium-term exposure revealed the phytotoxicity of emodin to soybeans in the form of growth inhibition. Therefore, it is concluded that emodin has herbicidal and antioxidant activities, depending on the time that the plants are exposed to it.

KEYWORDS: emodin, metabolic functions, phytotoxicity, mechanism of action, soybean.

Capítulo 1 – artigo de revisão

Ações metabólicas da emodina em plantas: uma atualização

Ezequias dos Santos Torres¹, Josielle Abrahão¹, Wanderley Dantas dos Santos¹, Osvaldo Ferrarese-Filho¹ e Rogério Marchiosi^{1*}

¹Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Autor para correspondência: *rmarchiosi@uem.br; +55 (44) 99824-5305

Resumo

A emodina é um metabólito secundário predominante em diversas espécies de ervas asiáticas, as quais são empregadas na medicina tradicional da região há mais de 2.000 anos. Dentre seus vários usos e atuais aplicações a emodina se destaca por sua ação anti-inflamatória, antioxidante, laxativa, antitumoral e alelopática, dentre outras. Considerando que a última revisão e organização dessas informações com enfoque em plantas foi no início dos anos 2.000, apresenta-se neste estudo um detalhamento e esclarecimento sobre diversos aspectos importantes para o desenvolvimento de pesquisas com emodina, considerando desde aspectos práticos de pesquisa como solubilidade da substância, a perspectivas de aplicação prática nos mais diversos campos como saúde humana e agricultura. Considerando, portanto, a importância e amplo potencial apresentado por essa antraquinona, tal atualização de suas informações servirá como ferramenta de pesquisa e ajuda para futuros trabalhos com a emodina.

Palavras-chave: Emodina, Funções metabólicas, Alelopatia, Mecanismo de ação

1. Introdução

Os metabólitos secundários das plantas são definidos como substâncias que não participam diretamente de processos biológicos primários como divisão celular, reprodução, fotossíntese e respiração. Por não estarem envolvidos diretamente nesses

processos, são geralmente produzidos em menor quantidade em relação aos metabólitos primários, de modo que por muito tempo se acreditou serem resíduos metabólicos ou simplesmente intermediários não funcionais. No entanto, com o desenvolvimento de pesquisas na área, tornou-se evidente a importância deles não somente para sobrevivência das plantas, como para a medicina, agricultura, indústria têxtil e outros (Bhatla 2018).

A classificação usualmente utilizada divide os cerca de 200000 metabólitos secundários conhecidos em aminas, aminoácidos não-proteicos, peptídeos, alcaloides, glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos, ácidos orgânicos, terpenoides, quinonas, poliacetilenos e fenólicos (Marchiosi et al. 2020). Antraquinonas representam o maior grupo de quinonas, além do maior grupo de pigmentos naturais com cerca de 700 compostos descritos. Elas são caracterizadas estruturalmente pela presença de três anéis aromáticos, com dois grupos cetônicos nas posições 9 e 10, sendo as quatro mais citadas: emodina, fisiona, catenarina e reno (Duval et al. 2016; Malik e Müller 2016). As antraquinonas podem ser encontradas em diversos órgãos vegetais tais como raízes, rizomas, frutos e flores (Mai et al. 2001; Diaz-Muñoz et al. 2018) de plantas de diversas famílias, dentre as quais, destacam-se Rhamanceae, Polygonaceae, Fabaceae, Liliace, Xanthorrhoeaceae e Leguminosae (Shukla et al. 2017).

A emodina (Fig. 1), nomeada segundo a IUPAC como 1,3,8-trihidroxi-6-metilantraceno-9,10-diona, é um metabólito secundário presente em espécies vegetais distribuídas por todo o globo (Duval et al. 2016). Ela possui um número considerável de funções biológicas, ganhando maior notoriedade por sua ação antitumoral, além das atividades em plantas (agindo como antioxidante, substância alelopática, influenciando na dispersão de sementes e outros), que serão o foco dessa revisão.

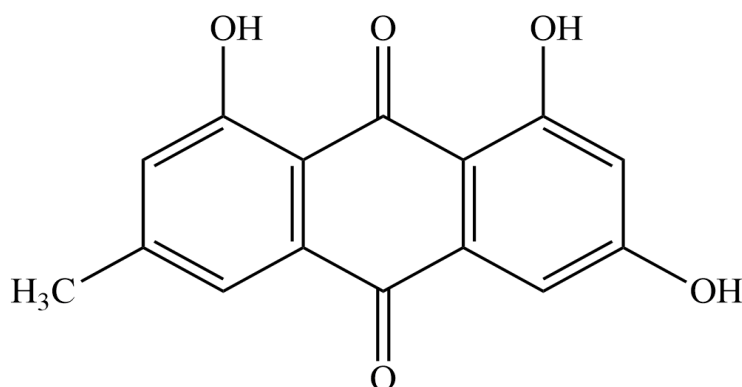


Fig. 1 Estrutura química da emodina.

2. Características químicas e biossíntese

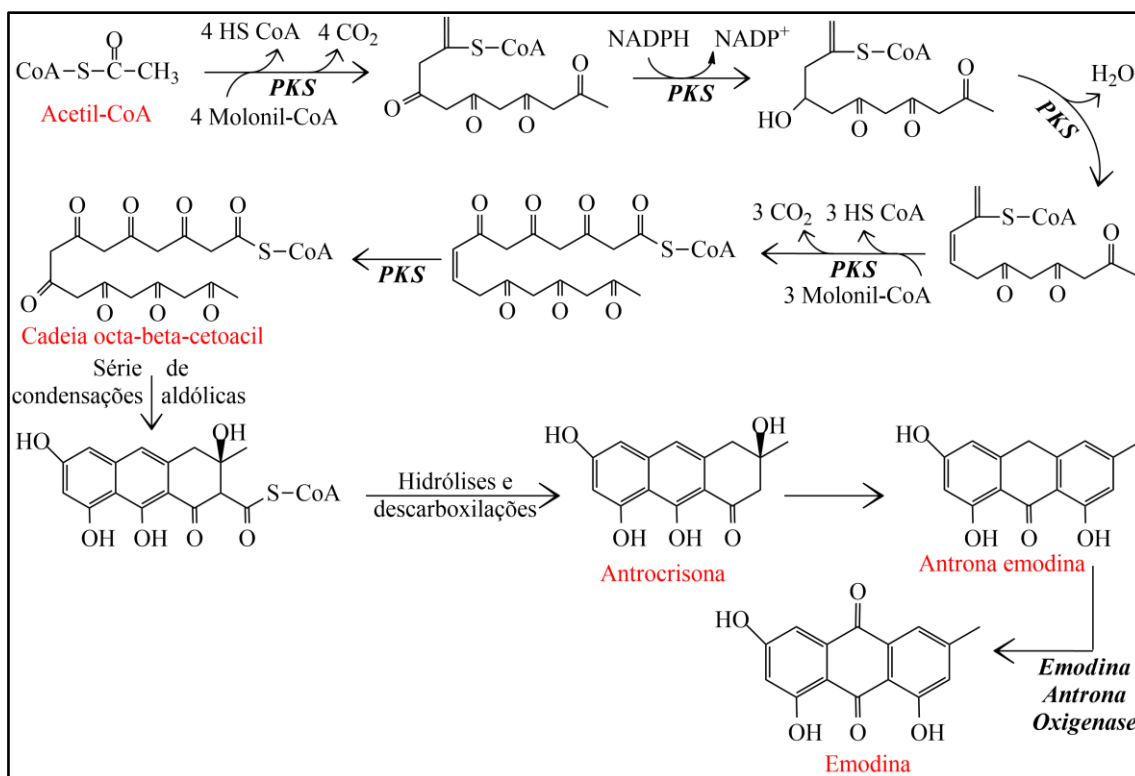
Possuindo o anel antraceno típico das antraquinonas, dois grupos cetônicos nas posições 9 e 10, três hidroxilas nas posições 1, 3 e 8 e um grupo metila na posição 6, a emodina apresenta coloração alaranjada, ponto de fusão em condição padrão de cerca de 257 °C e alta insolubilidade em água (O'Neil et al. 2001).

A biossíntese das antraquinonas é um tema que acumula diversos estudos, alguns abordados por meio de cultura de células vegetais, outros com fungos, e ainda com o uso de micro-organismos geneticamente modificados (Han et al. 2001; Cummings et al. 2019). Apesar disso, a completa elucidação das vias responsáveis pela produção desses compostos ainda não aconteceu. Sabe-se, em termos gerais, que há duas principais vias, sobretudo se tratando de espécies arbóreas: 1) a via corismato/ácido *o*-succinilbenzoico; e 2) a via policetílica, na qual a emodina é biossintetizada (Shukla et al. 2017; Diaz-Muñoz et al. 2018).

Embora não haja uma proposta para biossíntese específica da emodina, é possível sugerir uma rota analisando as vias de biossíntese da hipericina, uma antraquinona relevante por suas propriedades bioquímicas, e da qual a emodina é um dos precursores (Kirakosyan et al. 2004).

É sabido que várias das enzimas que realizam as reações para formação da emodina, assim como boa parte das substâncias químicas semelhantes a elas são chamadas genericamente de policetídeo cinases (PK) (Cseke et al. 2006). As PK realizam o processo que se inicia com a condensação entre uma molécula de acetil-CoA e uma de malonil-CoA, podendo haver alterações como no momento da adição dos blocos de construção da cadeia policetílica, trocando-se um malonil-CoA por um propionato ou mesmo acetato, uma vez que a exclusividade destes compostos nesta rota não está esclarecida (Karioti e Bilia 2010; Murthy et al. 2014).

A Figura 2 representa a biossíntese da emodina, com uma sequência de reações de condensação. Primeiramente, uma molécula de acetil-CoA condensa-se a quatro moléculas de malonil-CoA. Em seguida, a condensação de mais três moléculas de malonil-CoA leva a uma cadeia octacetídica, que após ciclizações e descarboxilações é transformada em emodina antrona devido a ação de policetídeo cinase sintase ou somente policetídeo sintases (PKS) do tipo III (Bais et al. 2003; Kirakosyan et al. 2004). E para a transformação final e biossíntese da emodina, estudam apontam que a enzima envolvida é a emodina antrona oxigenase (Karioti e Bilia 2010; Su et al. 2021).



3. Ocorrência em plantas

A emodina pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, algumas comuns no Brasil, como a babosa (*Aloe vera*) (Sanders et al. 2017) e o caníço-branco (*Imperata cylindrica*) (Hagan et al. 2013), plantas pertencentes as famílias Liliaceae e Poaceae, respectivamente. Alguns gêneros de ervas asiáticas, no entanto, representam o maior grupo de espécies em que a emodina é encontrada, com destaque para aqueles inseridos nas famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae (Izhaki 2002).

Pode-se dizer que, de maneira geral, a emodina é encontrada em todas as partes das plantas, variando sua concentração de acordo com o órgão e a espécie. Por exemplo, a presença da emodina tem sido reportada em raízes (Guo et al. 2011; Chen et al. 2014), rizomas (Zhang et al. 1988; Kumar et al. 2002), folhas (Samia e El-Sayyad Rass 2006; Farooq et al. 2013), casca (Locatelli et al. 2012), sementes (Priya et al. 2013) e flores (Zhang et al. 2005), sendo esses órgãos provindos de espécies de tamanhos muito diversos, isto é, de arbustos à árvores.

Jeelani et al. (2017) analisando espécies do gênero *Rumex*, verificaram que as espécies *R. crispus* e *R. orientalis* possuem maior quantidade de emodina no caule, em relação a raízes e folhas, sendo a maior diferença encontrada na segunda espécie com

cerca de seis vezes mais emodina no caule do que nas raízes. Nas espécies de *R. dentalus* e *R. nepalensis* não houve padrão de maior concentração entre órgãos analisados, isto é, a maior concentração de emodina na planta variou de acordo com a origem do espécime avaliado, e não pelo órgão vegetal.

Essas diferenças de concentração de emodina em cada parte da planta podem estar relacionadas às adaptações evolutivas das espécies, e como essa antraquinona teve suas funções modificadas a depender do ambiente (Izhaki 2002). Esta hipótese já está bem fundamentada e ganha mais força quanto mais trabalhos a investigam, tal como fizeram Fan et al. (2009, 2010) comprovando que não somente as quantidades de aleloquímicos, entre eles a emodina, diferiam entre amostras de *Polygonum cuspidatum* da China e Suíça, como também alguns metabólitos da amostra europeia, classificada lá como invasora, eram exclusivos e mais fortemente efetivos como aleloquímicos.

Neste sentido, Farooq et al. (2013) também comprovaram que há diferenças de conteúdo aleloquímico entre cariótipos da espécie *Rumex nepalensis*, família Polygonaceae, demonstrando que, de maneira geral, uma maior quantidade de cromossomos, representam maior quantidade total de antraquinonas, estando a emodina inclusa nesta análise.

Mediante isso, fica notório a dificuldade de estabelecer concentrações ou mesmo afirmar em quais órgãos vegetais a emodina é mais comumente encontrada, sem especificar espécie e região de origem. Deve-se destacar que a técnica de extração e de detecção são igualmente importantes para medir a concentração de um metabólito secundário (Zhao et al. 2005; Beňová et al. 2010). O trabalho de Genovese et al. (2010) aborda esse aspecto, realizando uma comparação de qual técnica de extração para a casca de *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae), considerando a determinação via HPLC, é mais eficiente para a emodina e outros compostos, concluindo que a extração com metanol 100% é a mais indicada nesta situação.

Duval et al. (2016) desenvolveram um trabalho extenso de revisão sobre os métodos de extração e análise de antraquinonas, conceituando e exemplificando com artigos o que é, por exemplo, a extração por micro-ondas e a análise através de cromatografia em fluido supercrítico. Destacaram ainda as famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae, as quais reúnem 81% das espécies vegetais em que os estudos de antraquinonas se concentraram. Este tipo de estudo tem se tornado mais comum à medida que se torna mais evidente como órgão, método de extração e análise podem influenciar nos resultados encontrados, com trabalhos apresentando abordagens

similares para grupos de compostos até mesmo maiores, como os metabólitos secundários no geral (Menghini et al. 2018).

Ademais, é necessário considerar também as formas glicosiladas e agliconas da emodina. Farooq et al. (2013), trabalhando com *Rumex nepalensis*, verificaram que entre as antraquinonas, a substância mais concentrada foi a emodina glicosilada (38,071 mg/g), seguida da emodina aglicona, ou livre (5,631 mg/g), e enfatizaram que é algo esperado, uma vez que muitos dos produtos naturais de plantas para serem melhor acumulados e estocados seguem esse caminho metabólico de glicosilação, o que aumenta sua estabilidade e solubilidade. Desse modo, somente inovar no método de extração e até recuperação da emodina como realizaram Wang et al. (2016) e Santos et al. (2017), pode talvez não ser a melhor maneira de quantificar o potencial de emodina que uma planta pode fornecer.

4. Alelopatia da emodina

Algumas das funções biológicas da emodina são as atividades imunossupressora, antiviral, laxativa e anti-inflamatória (Dong et al. 2016), além da atividade anticancerígena, a qual tem ganho mais destaque e pesquisas, vide as revisões específicas de Srinivas et al. (2007) e Sanders et al. (2017) sobre o tema. Já entre as ações em plantas, a alelopatia da emodina, de maneira isolada, começou a ser explorada na década de 1990.

Inoue et al. (1992) investigando os efeitos da emodina sobre alface (*Lactuca sativa*), grama timóteo (*Phleum pratense*) e amaranto verde (*Amaranthus viridis*), perceberam que todas as espécies apresentaram uma redução de pelo menos 90% no crescimento das raízes a 100 ppm ($3,7 \times 10^{-4}$ M) de emodina, com a alface sendo a espécie mais sensível com 80% de redução já na concentração de 50 ppm ($1,84 \times 10^{-4}$ M).

Hasan (1998) realizou um estudo comparativo sobre a toxicidade da emodina utilizando uma espécie monocotiledônea, e outra dicotiledônea, isto é, milho (*Zea mays* var. *evarta*) e girassol (*Helianthus annuus*), respectivamente. Ele verificou uma dose letal mediana (LD₅₀) a 65 mg.L⁻¹ sobre a germinação de sementes de milho, e a 45 mg.L⁻¹ sobre a germinação de girassol, representando uma maior sensibilidade por parte desta última, que até hoje não foi explicada ou discutida, podendo estar ou não relacionada com a classe das plantas.

O mais recente trabalho de investigação da ação alelopática da emodina isolada foi o de Tucker Serniak (2016): utilizando o rabanete (*Raphanus sativus*) como planta

modelo, ela constatou uma redução entre o tamanho médio das raízes tratadas com 200 mg.L⁻¹ de emodina de aproximadamente 16% em relação ao controle.

Além dos trabalhos citados, outros buscaram avaliar o caráter alelopático da emodina a partir de extratos de folhas ou raízes de plantas onde esta é encontrada, ou ainda estruturas químicas análogas a ela. Este foi o caso de Romagni et al. (2004), que testaram a fitotoxicidade de análogos da emodina, por serem mais facilmente solubilizados em água.

Vrchotová e Šerá (2008) trabalharam avaliando o extrato do rizoma de plantas, das quais eles sabiam conter emodina e outros compostos, como a fisciona, na inibição da germinação de sementes. Klionsky et al. (2011) e Šerá (2012) usaram folhas secas de plantas que contém emodina como parte de um substrato, e associaram os efeitos alelopáticos encontrados com a sobrevivência e adaptação das espécies das quais foram recolhidas as folhas, em novos habitats.

Ademais, Pinzone et al. (2018) verificaram que exsudatos das ervas *Rhamnus cathartica* (Europa) e *Fallopia japonica* (Ásia) afetam mais severamente espécies arbóreas de *Ulmus* e *Betula* (presentes na Europa, Ásia e América do Norte) alopáticas a elas, isto é, as espécies de *Ulmus* e *Betula* mais afetadas por *R. cathartica*, por exemplo, foram as presentes na Ásia e América do Norte. Os resultados do trabalho reforçam a teoria de que a adaptação de algumas plantas está ligada diretamente a produção de substâncias alelopáticas, tal qual a emodina, e sua liberação no ambiente, bem como plantas invasoras usam isto como ferramenta de adaptação.

Izhaki (2002) traz em sua revisão um ponto importante que é como metabólitos secundários, não somente a emodina, afetam a disponibilidade de minerais no solo, e de como isso afeta outras plantas. A emodina já foi relacionada diretamente a diminuição de manganês (Mn²⁺) e aumento de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) disponíveis em solo (Inderjit e Nishimura 1999), e somado ao fato de que a emodina pode permanecer estável neste ambiente por meses (Inoue et al. 1992), este pode ser um outro tipo de mecanismo de alelopátia da qual essa antraquinona se utiliza.

Há ainda de se considerar que esse tipo de acúmulo de metabólitos secundários no solo afeta não somente plantas, como também micro-organismos e fungos. Zhang et al. (2011) demonstraram como a maior concentração desses produtos naturais influenciaram diretamente no decréscimo da atividade do fitopatógeno *Pythium ultimum*, representando uma vantagem adaptativa. Além da inibição direta já conhecida contra micro-organismos importantes para a agricultura (Le Van 1984; Basu et al. 2005; Ayo et al. 2007),

apontando que a ação da emodina como substância alelopática se dá de diferentes maneiras, as quais podem ocorrer inclusive simultaneamente.

5. Funções ecológicas

5.1. Dispersão de sementes

Muitos frutos que dependem da dispersão de animais contêm metabólitos secundários (Herrera 1982), sendo que a emodina já foi encontrada nos frutos de algumas espécies como *Rhamnus prinoides* (Abegaz e Peter 1995) e *Senna obtusifolia* (Yue et al. 2018) que se utilizam desta estratégia.

Para entender a influência da emodina neste mecanismo, é preciso pensar na hipótese *trade-off*. Esta diz que o conteúdo de metabólitos secundários em frutas de espécies dependentes da dispersão por animais é uma aposta. Por um lado, o conteúdo químico nas frutas evita o ataque de micro-organismos como fungos e bactérias, além de evitar o ataque de predadores de sementes. Por outro, diminui a ação de organismos dispersores que agem como espécies mutualísticas (Cipollini e Levey 1997).

Essa hipótese foi testada para a emodina e teve suporte nos resultados do trabalho de Tsahar et al. (2002), que apesar de não ser um trabalho definitivo por limitações como análise somente de emodina livre (desconsiderando a abundante forma glicosilada), curto tempo de análise de dois anos em campo, além dos possíveis efeitos sinérgicos de metabólitos secundários juntos, aponta justamente para o provável papel da emodina como protetor contra herbívoros e predadores de sementes, sem impedir a ação de dispersores do fruto de *Rhamnus alaternus*.

Além deste trabalho, o papel da emodina sobre a dispersão de sementes é discutido por Izhaki et al. (2002) e posteriormente por Tsahar et al. (2003), onde alguns outros aspectos são considerados, enfatizando na relação entre o fruto e a espécie aviária *Pycnonotus xanthopygos*, propondo que a emodina poderia aumentar a distância de dispersão de sementes inclusive por causar um efeito retardante no funcionamento do intestino das aves.

É necessário destacar, no entanto, que grande parte dos resultados encontrados nestes trabalhos não são suficientes para comprovar todas as hipóteses e teorias propostas,

como os próprios autores realçam. E, a emodina, por ser encontrada em diversas regiões geográficas distintas, em espécies distintas, possui adaptações e desempenha papéis ecológicos diversos a depender da situação.

O trabalho mais completo nesta temática realizou uma ampla análise de como a emodina afeta negativamente o consumo de frutos por animais dispersores de sementes, considerando parâmetros bioquímicos (biossíntese), ecológicos (interações diversas com macro e micro-organismos) e dentro de um contexto evolutivo. A partir desta análise, alguns padrões foram notados, como, por exemplo: o conteúdo de metabólitos secundários decair em frutos à medida que eles amadurecem, tal qual para a emodina (Levey et al. 2007).

5.2. *Dissuasor alimentar*

DeLiberto e Werner (2016) fizeram uma revisão dos efeitos das antraquinonas como agentes de controle agrícola e aplicação efetiva na proteção de grãos de interesse econômico e alimentar, destacando que além de agirem como dissuasor alimentar de insetos, as antraquinonas podem ser efetivas contra mamíferos, peixes e até formigas. Neste trabalho, a emodina foi uma das poucas antraquinonas citadas especificamente.

Um dos primeiros trabalhos a medir o potencial de dissuasor alimentar da emodina isolada aplicou diferentes metodologias de avaliação. Uma primeira metodologia foi avaliar o desfolhamento natural de espécies vegetais por herbívoros e relacionar o aumento ou diminuição ao conteúdo de emodina, o que apesar de resultados não definitivos, sugeriu que o menor desfolhamento de *Rhamnus alnifolia* foi devido seu conteúdo de emodina em conjunto a outros compostos químicos (Trial e Dimond 1979).

Outra forma de avaliar o potencial dissuasor aplicado no mesmo estudo foi através da asperção de 4 mg de emodina, diluídos em 1 mL de clorofórmio, nas folhas de *Prunus pensylvanica*, a cerejeira de fogo, e comparar com plantas não tratadas, pelos cinco dias seguintes, o consumo das folhas por larvas da espécie de mariposa *Lymantria dispar*. O controle somente com água e somente com clorofórmio apresentaram maiores taxas de consumo de folhas, chegando a taxas de consumo até 90% maiores, não sendo notado diferenças apenas em dias de chuva intensa. Ademais, estes dados foram relacionados aos encontrados em testes de toxicidade com larvas de *L. dispar*, que indicaram que a emodina a 150 mg.L⁻¹ foi capaz de causar uma mortalidade superior a 80%, e a concentração de 450 mg.L⁻¹, uma mortalidade de 100% (Trial e Dimond 1979).

No trabalho de Georges et al. (2008) o extrato metanólico de *Cassia nigra*, que tem a emodina como um dos principais metabólitos em seu conteúdo, foi capaz de diminuir o peso corporal em 74% das larvas de *Heliothis virescens*, a lagarta-das-maçãs, uma das principais pragas agrícolas atuais para culturas como tabaco, soja e algodão. Além disso, nesse mesmo estudo, a emodina isolada, na concentração de 12,5 µg.mL⁻¹ foi capaz de causar uma mortalidade de mais de 50% nas larvas de *Anopheles gambiae*, uma das espécies de mosquito responsáveis por transmissão da malária, demonstrando não somente o potencial dissuasor, mas também inseticida deste metabólito secundário.

Tashar et al. (2003), no entanto, não encontraram resultados estatisticamente significativos na redução de ingestão de comida tratada com emodina na espécie de pássaro *Pycnonotus xanthopygos*. Porém, é necessário destacar que este estudo possui um outro foco, e, portanto, uma metodologia bem diferente dos acima citados, ou do trabalho de Akhtar et al. (2012), os quais demonstraram com bioensaios de escolha e consumo de disco foliar que, para *Trichoplusia ni*, a emodina não é a antraquinona mais efetiva como dissuasor alimentar.

Mais recentemente, aplicando extratos de *Senna obtusifolia* em plantações de soja, *Glycine max* L., Yue et al. (2018) conseguiram reduzir o consumo indesejado dessa leguminosa por *Odoicoileus virginianus*, uma espécie de veado que comumente traz danos econômicos na região do estudo. E, caracterizam o crisofenol e a emodina como principais antraquinonas presentes no extrato.

O potencial da emodina como dissuasor alimentar é mais uma das diversas funcionalidades que ela pode ter, e algo ainda a ser muito explorado de diversas maneiras, inclusive em aspectos econômicos. Yue et al. (2020), por exemplo, demonstraram que extratos de *S. obtusifolia* sobre plantas de soja também protege a espécie contra *Chrysodeixis includens*, o looper de soja. Demonstrando a eficácia contra vertebrados e invertebrados que DeLiberto e Werner (2016) apontaram.

5.3. Atividade antimicrobiana

O estudo de Anke et al. (1980) isolando emodina de espécies de *Aspergillus*, e posteriormente avaliando seu potencial antimicrobiano, é um dos primeiros trabalhos a demonstrarem tal efeito, sendo este metabólito secundário capaz de inibir o crescimento de 42% das espécies testadas.

Basu et al. (2005) compararam a capacidade antimicrobiana da emodina com a da fisicina em 12 espécies de bactérias, sendo seis gram positivas e as outras seis gram negativas. A emodina se mostrou mais eficiente como bactericida de maneira geral, tanto em número total de espécies inibidas como também em Concentração Mínima Inibitória (MIC), este último variando de 0,5 à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em três espécies de *Bacillus*.

Espécies de bactérias como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, causadoras de doenças humanas conhecidas, também já foram testadas e comprovadamente inibidas por concentrações acima de 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de emodina. No mesmo trabalho, o bioensaio toxicológico com a *Artemia salina* Leach apresentou uma LC_{50} de apenas 42,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de emodina, um valor bem abaixo dos 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ requeridos, segundo Meyer et al. (1982) e Parra et al. (2001), para uma substância ser considerada um bioativo extraído de plantas (Ayo et al. 2007).

De maneira similar a certos trabalhos de alelopatia que não utilizam a emodina isolada, mas extratos de plantas que sabidamente contém emodina, há estudos que utilizam extratos obtidos a partir de diferentes metodologias para avaliar o potencial antimicrobiano destes. Zhang et al. (2010), por exemplo, com o extrato aquoso de aglomerados de algumas espécies de bambu, conseguiram inibir todos os micro-organismos testados, tal qual o fungo *Penicillium citrinum* e a bactéria *Escherichia coli*.

Outras metodologias de aplicação da emodina vêm sendo feitas de modo a aumentar as informações de seu uso como antimicrobiano. Neste sentido, avaliar o potencial entre extratos, frações de solventes e fitocompostos isolados (Rolta et al. 2020), uso contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (Cao et al. 2015), além da inibição do crescimento de biofilmes bacterianos (Janeckzo et al. 2017; Yan et al. 2017) são alguns dos testes que vem sendo realizados, aumentando a robustez de informações sobre essa aplicabilidade da emodina.

Como mostrado, a emodina, seja ela extraída de plantas (Lee et al. 2013) ou fungos (Luo et al. 2019), tem uma ampla atividade antimicrobiana. O mecanismo de ação contra esses micro-organismos ainda não está totalmente esclarecido, mas alguns trabalhos dão indicativos sobre como a emodina afeta o funcionamento das células microbianas. Zhou et al. (2011) realizaram alguns testes na bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, comprovando que a emodina foi capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular, indicando danos a esta. Além de que as células tratadas apresentaram um

decréscimo de atividade de 25,5 % e 53,8 % nas enzimas malato desidrogenase (MDH) e succinato desidrogenase (SDH), respectivamente.

Li et al. (2016) trabalharam com a bactéria gram negativa *Haemophilus parasuis*, causadora da doença de Glässer, um micro-organismo importante no mercado de carne suína. Neste estudo comprovaram que a emodina causa danos na integridade das membranas celulares (exterior e interior) aumentando a permeabilidade, causando mudança no formato das células, plasmólise e até rupturas na parede celular de *H. parasuis*. Com relação à MIC, os resultados foram similares nos trabalhos de Zhou et al. (2011) e Li et al. (2016), sendo $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de emodina os valores para *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus parasuis*, nesta ordem.

Vale destacar que estes dados foram mais específicos para atividade antimicrobiana de micro-organismos causadores de doenças em animais, incluindo os seres humanos. Outros micro-organismos como fitopatógenos ou relacionados de maneira mais direta ao crescimento ou inibição de plantas foram citados no tópico sobre alelopatia.

5.4. Atividade antioxidante

A investigação sobre os efeitos antioxidantes das antraquinonas acontece há anos. Malterud et al. (1993), por exemplo, já trouxeram dados sobre peroxidação lipídica de sete moléculas e também informações sobre a relação dessa atividade com a capacidade de sequestrar radicais livres.

O potencial antioxidante da emodina foi descoberto por trabalhos que produzem extratos diversos (metanólicos, etanólicos, hexânico, etc) de plantas, testam esses extratos como antioxidantes, e a partir daí isolam as moléculas e as testam. Yen et al. (1998) observaram que um extrato metanólico de sementes de *Cassia tora* L., na concentração de 200 ppm, foi capaz de inibir em até 70% da peroxidação lipídica do ácido linoleico, um método comum de avaliação de potencial antioxidante. O extrato metanólico foi então fracionado em oito frações através de cromatografia com uma coluna Amberlite XAD-2, estas então testadas novamente e a fração V (quinta), foi a com maior atividade antioxidante: 85,8%. E, através de cromatografia por gel de filtração a emodina foi identificada como principal componente da fração V.

Outros trabalhos utilizando diferentes metodologias também encontraram resultados positivos para o potencial antioxidante da emodina (Ng et al. 2003; Jung et al. 2004; Martínez e Benito 2005). E, em paralelo, intensificam-se os estudos sobre

mecanismo de ação da emodina como agente antioxidante, com Yen et al. (2000) propondo que este estaria relacionado à capacidade de captura de radicais livres.

Através de análises de química teórica e computacional, como cálculos de entalpia de dissociação de ligações (BDE) dos grupos O-H na emodina, que mediram a diferença de calor entre a formação de emodina e radicais correspondentes. Ou ainda com os estudos teóricos funcionais de densidade (DFT) foi perceptivo a importância do grupo 3'-OH e do anel, onde este se localiza, para o potencial antioxidante da emodina. Com isso, demonstrou-se como a análise da estrutura química pode fornecer informações que ajudam a entender os dados encontrados *in vitro* (Marković e Manojlović 2009).

Apesar disso, existem resultados contraditórios sobre o efeito antioxidante da emodina. Qu et al. (2013) e Cui et al. (2014) através de estudos *in vitro* com células animais (humanas e não humanas) relataram um efeito negativo em relação à atividade antioxidante quando constataram os danos na membrana mitocondrial causados por peroxidação lipídica, aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição da enzima superóxido dismutase (SOD), danos ao DNA e consequente efeito citotóxico deste composto.

Brkanac et al. (2015) também encontraram que a emodina causou um aumento na concentração de ROS, danos ao DNA e um desempenho ruim como agente antioxidante em células sanguíneas humanas. No estudo, eles expõem que parte desses resultados pode ser explicado pelas variações na maneira que a emodina é disponibilizada às células ou organismos, pela concentração, e se a emodina foi utilizada como composto isolado ou como extrato, ou seja, como ela é biodisponibilizada.

Biodisponibilidade é um termo utilizado inicialmente na farmacologia para definir a extensão e taxa na qual determinada droga poderia ser encontrada na circulação geral de um organismo (Van de Waterbeemd e Testa 2009), mas atualmente pode ser entendida como a capacidade de uma substância ser um bioativo, ou seja, capaz de impactar no metabolismo e fisiologia de um sistema biológico, mesmo que seja uma alteração que objetiva a sua excreção ou eliminação, considerando aspectos a absorção e distribuição em tecidos (Stahl et al. 2002; Shahidi e Peng 2018).

Após revisões e análises, hoje, sabe-se que a emodina pode apresentar tanto atividade oxidante, como antioxidante, a depender da dose e do sistema aplicado (Ya et al. 2020). Tal conclusão explica todos os resultados positivos e negativos nos estudos apresentados até aqui, incluindo também o fator de ação conjunta das antraquinonas ou extratos mais genéricos (Tian e Hua 2005; Bathia et al. 2020).

Recentemente, Rossi et al. (2020) fizeram um trabalho de teor mais físico-químico e computacional, comprovando que a emodina pode sim ser entendida como agente antioxidante, e um de alta potência. Entre as técnicas aplicadas incluem análises por cristalografia de raio x, DFT, e uma recente metodologia de análise de voltametria hidrodinâmica, chamada método de eletrodo de disco em anel rotativo (RRDE).

Vale destacar que foi descrito a maneira como a emodina age quimicamente com duas moléculas superóxidos: a primeira se dando por um empilhamento de uma molécula superóxido e a porção quinona da emodina, estabilizada através de um pareamento π - π , resultando numa certa aromatização da quinona pelo deslocamento de um elétron para o anel, este mecanismo de empilhamento inclusive é o presente nos cristais de emodina (Rossi et al. 2020). A segunda interação acontece com a hidroxila 3', corroborando os dados de Marković e Manojlović (2009) sobre a importância desse grupo para o potencial antioxidante da emodina, e que resulta num complexo estável (Rossi et al. 2020).

É necessário, no entanto, ressaltar que todos os dados aqui expostos são sobre estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, com dados de animais humanos e não humanos, e que até os dados sobre mudanças nas membranas mitocondriais, também não podem ser entendidos como fielmente iguais às que podem ocorrer em células vegetais, uma vez que para chegar até essas organelas celulares, o metabolismo vegetal pode afetar a ação da emodina acrescentando mais uma variância em seu mecanismo. Esta escassez de dados se dá entre outros fatores, pela dificuldade de tornar a emodina pura e isolada biodisponível às células, tecidos ou organismos, independente se vegetal, fúngico ou mesmo animal. Neste último caso, Li et al. (2020) comentam especificamente sobre a absorção intestinal baixa, rápida degradação e que a utilização oral da emodina apresenta baixa biodisponibilidade em ratos.

6. Agradecimentos

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, órgão responsável por financiar este estudo.

7. Declaração

Conflito de interesses

Todos os autores declaram que não possuem conflitos de interesse.

8. Bibliografia

Abegaz BM, Peter MG (1995) Emodin and emodinanthrone rhamnoside acetates from fruits of *Rhamnus prinoides*. *Phytochemistry* 39: 1411-1414

Akhtar Y, Isman MB, Niehaus LA, Lee CH, Lee HS (2012) Antifeedant and toxic effects of naturally occurring and synthetic quinones to the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Crop Protection* 31: 8-14

Anke H, Kolthoum I, Zahner H, Laatsch M (1980) The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. Occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity. *Arch. Microbiol* 126: 223-230

Ayo RG, Amupitan JO, Zhao Y (2007) Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1, 6, 8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. *African Journal of Biotechnology* 6: 1276-1279

Bais HP, Vepachedu R, Lawrence CB, Stermitz FR, Vivanco JM (2003) Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) *Journal of Biological Chemistry* 278: 32413–32422

Basu S, Ghosh A, Hazra B (2005) Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 19: 888-894

Beňová B, Adam M, Pavlíková P, Fischer J (2010) Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed. *The Journal of Supercritical Fluids* 51: 325-330

Bhatia A, Arora S, Nagpal A, Singh B (2020) Screening of rhizomes of *Rheum emodi* Wall. Ex. Meissen for antimutagenic potential employing Ames assay. *The Nucleus* 63: 167-177

Bhatla SC (2018) Secondary Metabolites. In: Bhatla SC, Lal MA (eds) *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore

Brkanac SR, Gerić M, Gajski G, Vujčić V, Garaj-Vrhovac V, Kremer D, Domijan AM (2015) Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 73: 923-929

Cao F, Peng W, Li X, Liu M, Li B, Qin R, Jiang W, Cen Y, Pan X, Yan Z, Xiao K, Zhou H (2015) Emodin is identified as the active component of ether extracts from

Rhizoma Polygoni Cuspidati, for anti-MRSA activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 93: 485-493

Chen T, Liu Y, Zou D, Chen C, You J, Zhou G, Sun J, Li Y (2014) Application of an efficient strategy based on liquid-liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum*. *Journal of separation science* 37: 165-170

Cipollini M and Levey DJ (1997) Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *American Naturalist* 150: 346-372

Cseke LJ, Lu CR, Kornfeld A, Kaufman PB, Kirakosyan A (2006) How and Why These Compounds Are Synthesized by Plants. In: Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Briellmann HL (eds) *Natural Products from Plants*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton

Cui YT, Liu B, Xie J, Xu P, Habte-Tsion HM, Zhang YY (2014) The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish & shellfish immunology* 38: 74-79

Cummings M, Peters AD, Whitehead GF, Menon BR, Micklefield J, Webb SJ, Takano E (2019) Assembling a plug-and-play production line for combinatorial biosynthesis of aromatic polyketides in *Escherichia coli*. *PLoS Biology* 17(7)

DeLiberto ST, Werner SJ (2016) Review of anthraquinone applications for pest management and agricultural crop protection. *Pest Management Science* 72: 1813-1825

Diaz-Muñoz G, Miranda IL, Sartori SK, de Rezende DC, Diaz MAN (2018) Anthraquinones: An Overview. In: Atta-ur Raman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 58. Elsevier, Amsterdam, pp 313-338

Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L, Huyiligeqi, Ni J (2016) Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research* 30: 1207-1218

Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E (2016) Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products* 94: 812-833

Fan P, Hay AE, Marston A, Lou H, Hostettmann K (2009) Chemical variability of the invasive neophytes *Polygonum cuspidatum* Sieb. and Zucc. and *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 24-34

Fan P, Hostettmann K, Lou H (2010) Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (Polygonaceae). *Chemoecology* 20: 223-227

Farooq U, Pandith SA, Saggoo MIS, Lattoo SK (2013) Altitudinal variability in anthraquinone constituents from novel cytotypes of *Rumex nepalensis* Spreng - a high value medicinal herb of North Western Himalayas. *Industrial Crops and Products* 50: 112-117

Genovese S, Tamaro F, Menghini L, Carlucci G, Epifano F, Locatelli M (2010) Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones aloe-emodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione in the bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae) *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 21: 261-267

Georges K, Jayaprakasam B, Dalavoy SS, Nair MG (2008) Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource technology* 99: 2037-2045

Guo S, Feng B, Zhu R, Ma J, Wang W (2011) Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules* 16: 1201-1210

Hagan DL, Jose S, Lin CH (2013) Allelopathic exudates of cogongrass (*Imperata cylindrica*): implications for the performance of native pine savanna plant species in the southeastern US. *Journal of chemical ecology* 39: 312-322

Han YS, Van der Heijden R, Verpoorte R (2001) Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 201-220.

Hasan HAH (1998) Studies on toxigenic fungi in roasted foodstuff (Salted seed) and halotolerant activity of emodin-producing *Aspergillus wentii*. *Folia microbiologica* 43: 383-391

Herrera CM (1982) Defense of ripe fruit from pests: its significance in relation to plant-disperser interactions. *The American Naturalist* 120: 218-241

Inderjit B, Nishimura H (1999) Effect of the anthraquinones emodin and physcion on availability of selected soil inorganic ions. *Annals of applied biology* 135: 425-429

Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J (1992) Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae) *Journal of Chemical Ecology* 18: 1833-1840

Izhaki I (2002) Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist* 155: 205-217

Izhaki I, Tsahar E, Paluy I, Friedman J (2002) Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist* 156: 217-223

Janeczko M, Masłyk M, Kubiński K, Golczyk H (2017) Emodin, a natural inhibitor of protein kinase CK2, suppresses growth, hyphal development, and biofilm formation of *Candida albicans*. *Yeast* 34: 253-265

Jeelani SM, Farooq U, Gupta AP, Lattoo SK (2017) Phytochemical evaluation of major bioactive compounds in different cytotypes of five species of *Rumex* L. *Industrial Crops and Products* 109: 897-904

Jung HA, Chung HY, Yokozawa T, Kim YC, Hyun SK, Choi JS (2004) Alaternin and emodin with hydroxyl radical inhibitory and/or scavenging activities and hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Archives of pharmacal research* 27: 947-953

Karioti A, Bilia AR (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 562-594

Kirakosyan A, Sirvent TM, Gibson DM, Kaufman PB (2004) The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) *Biotechnology and applied biochemistry* 39: 71-81

Klionsky SM, Amatangelo KL, Waller DM (2011) Above-and belowground impacts of European buckthorn (*Rhamnus cathartica*) on four native forbs. *Restoration Ecology* 19: 728-737

Kumar SP, Srinivas PV, Rao JM (2002) A new and convenient method for quantitative estimation of chrysophanol, an antioxidant in the rhizomes of *Rheum emodi* (Roxb) *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 15: 128-131

Le Van T (1984) Emodin a fungal metabolite and the effects of emodin on the growth of some soil microorganisms. *Acta Agraria et Silvestria Seriea Agraria* 23: 235-242

Lee NH, Lee SM, Song DH, Yang JY, Lee HS (2013) Antimicrobial effect of emodin isolated from *Cassia tora* Linn. seeds against food-borne bacteria. *J Appl Biol Chem* 56: 187-189

Levey DJ, Tewksbury JJ, Izhaki I, Tsahar E, Haak DC (2007) Evolutionary Ecology of Secondary Compounds in Ripe Fruit: Case Studies with Capsaicin and Emodin. In: Dennis AJ (Ed) *Seed dispersal: theory and its application in a changing world*. CABI, Wallingford

Li L, Song X, Yin Z, Jiab R, Lia Z, Zhoua X, Zoua Y, Lia L, Yina L, Yuec G, Yea G, Lva C, Shia W, Fuaa Y (2016) The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis* in vitro. *Microbiological research* 186:139-145

Li Q, Gao J, Pang X (2020) Molecular Mechanism of Emodin Action: as an anti-cardiovascular disease drug. *Frontiers in Pharmacology* 11: 1363

Locatelli M, Genovese S, Carlucci G, Kremer, D., Randic M, Epifano F (2012) Development and application of high-performance liquid chromatography for the study of two new oxyprenylated anthraquinones produced by *Rhamnus* species. *Journal of Chromatography A* 1225: 113-120

Luo H, Qing Z, Deng Y, Deng Z, Tang XA, Feng B, Lin W (2019) Two polyketides produced by endophytic *Penicillium citrinum* DBR-9 from medicinal plant *Stephania kwangsiensis* and their antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Natural Product Communications*. <https://doi.org/10.1177/1934578X19846795>

Mai LP, Guéritte F, Dumontet V, Tri MV, Hill B, Thoison O, Guénard D, Sévenet T (2001) Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *Journal of natural products* 64: 1162-1168

Malik EM, Müller CE (2016) Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews* 36: 705-748

Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB (1993) Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 47: 77-85

Marchiosi R, dos Santos WD, Constantin RP, de Lima RB, Soares AR, Finger-Teixeira A, Mota TR, Oliveira DM, Foletto-Felipe MP, Abrahão J, Ferrarese-Filho O (2020) Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews* 19: 865-906

Marković ZS, Manojlović NT (2009) DFT study on the reactivity of OH groups in emodin: structural and electronic features of emodin radicals. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 140: 1311

Martínez MJA, Benito PB (2005) Biological activity of quinones. In: Atta-ur Raman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 30. Elsevier, Amsterdam, pp 303–366

Menghini L, Bellagamba G, Fabiana M, De Luca E, Armellani L, Cifelli R, Granese A, Kucukerkan NZ, AA, Zengin A (2018) *Analytical Procedures for Secondary*

Metabolites Determination: Recent Trends and Future Perspectives. *Letters in Drug Design & Discovery* 15: 281-293

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ, McLaughlin JL (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* 45: 31-34

Murthy HN, Kim YS, Park SY, Paek KY (2014) Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 98: 9187-9198

Ng TB, Liu F, Lu Y, Cheng CHK, Wang Z (2003) Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Aster tataricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 136: 109-115

O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Budavari S (2001) The merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co. Inc, 767: 4342

Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8: 395-400

Pinzone P, Potts D, Pettibone G, Warren R (2018) Do novel weapons that degrade mycorrhizal mutualisms promote species invasion?. *Plant ecology* 219: 539-548

Priya ES, Selvan PS, Prakash PP (2013) HPTLC method development and validation for simultaneous analysis of Emodin and Chrysophanol in *Cassia tora* Linn methanolic extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36: 2525-2533

Qu K, Shen NY, Xu XS, Su HB, Wei JC, Tai MH, Meng FD, Zhou L, Zhang YL, Liu C (2013) Emodin induces human T cell apoptosis in vitro by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 1217-1228

Rolta R, Kumar V, Sourirajan A, Upadhyay NK, Dev K (2020) Bioassay guided fractionation of rhizome extract of *Rheum emodi* wall as bio-availability enhancer of antibiotics against bacterial and fungal pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 112867

Romagni JG, Rosell RC, Nanayakkara NPD, Dayan FE (2004) Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals* 1: 13-33

Rossi M, Wen K, Caruso F, Belli S (2020) Emodin scavenging of superoxide radical includes π - π interaction. X-ray crystal structure, hydrodynamic voltammetry and theoretical studies. *Antioxidants* 9: 194

Samia M, El-Sayyad Rass SA (2006) Phytochemical study of some Cassia species cultivated in Egypt. *Journal African Biotechnology* 806-809

Sanders B, Ray AM, Goldberg S, Clark T, McDaniel HR, Atlas SE, Farooqi A, Konefal J, Lages LC, Lopez J, Rasul A, Tiozzo E, Woolger JM, Lewis JE (2017) Anti-cancer effects of aloe-emodin: A systematic review. *Journal of clinical and translational research* 3: 283

Santos ÊRM, Oliveira HNM, Oliveira EJ, Azevedo SHG, Jesus AA, Medeiros AM, Dariva C, Sousa EMBD (2017) Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids* 122: 1-9

Šerá B (2012) Effects of Soil Substrate Contaminated by Knotweed Leaves on Seed Development. *Polish journal of environmental studies* 21

Shahidi F, Peng H (2018) Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives* 4: 11-68

Shukla V, Asthana S, Gupta P, Dwivedi PD, Tripathi A, Das M (2017) Toxicity of naturally occurring anthraquinones. *Advances in Molecular Toxicology* 11: 1-50

Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan P, Srinivas P (2007) Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal research reviews* 27: 591-608

Stahl W, Van Den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gärtner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Rice-Evans C, Southon S, Van Vliet T, Viña-Ribes J, Williamson G, Astley SB (2002) Bioavailability and metabolism. *Molecular aspects of medicine* 23: 39-100

Su H, Li J, Chen S, Sun P, Xing H, Yang D, Zhang X, Li M, Wei J (2021) Physiological and Transcriptomic Analysis Provide Insight into Low Temperature Enhancing Hypericin Biosynthesis in *Hypericum perforatum*. *Molecules* 26: 2294

Tian B, Hua Y (2005) Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chemistry* 91: 413-418

Trial H, Dimond JB (1979) Emodin in buckthorn: a feeding deterrent to phytophagous insects. *The Canadian Entomologist* 111: 207-212

Tsahar E, Friedman J, Izhaki I (2002) Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin, in *Rhamnus alaternus* fruit pulp. *Oikos* 99: 290-299

Tsahar E, Friedman J, Izhaki I (2003) Secondary metabolite emodin increases food assimilation efficiency of Yellow-vented Bulbuls (*Pycnonotus xanthopygos*). *The Auk* 120: 411-417

Tucker Serniak L (2016) Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. *Weed research* 56: 97-101

Van de Waterbeemd H, Testa B (2009) Introduction: The Why and How of Drug Bioavailability Research. In: Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (eds) *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption, and Bioavailability*, vol 40. Wiley Online Library, pp 1–6

Vrchotová N, Šerá B (2008) Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. *Plant Soil Environ* 54: 301-303

Wang Z, Hu J, Du H, He S, Li Q, Zhang H (2016) Microwave-assisted ionic liquid homogeneous liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in *Rheum palmatum* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 125: 178-185

Ya CUI, Liu-Jing CHEN, Huang T, Jian-Qiong YING, Juan LI (2020) The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chinese Journal of Natural Medicines* 18: 425-435

Yan X, Gu S, Shi Y, Cui X, Wen S, Ge J (2017) The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. *Archives of microbiology* 199: 1267-1275.

Yen GC, Chen HW, Duh PD (1998) Extraction and identification of an antioxidative component from *Jue Ming Zi* (*Cassia tora* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 820-824

Yen GC, Duh PD, Chuang DY (2000) Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food chemistry* 70: 437-441

Yue Z, Krishnan N, Tseng TM (2020) Antifeedant Effect of Sickle Extract on Soybean Looper *Chrysodeixis includes* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 65: 293-300

Yue Z, Tseng TM, Lashley M (2018) Characterization and Deer-Repellent Property of Chrysophanol and Emodin from Sicklepod Weed. *American Journal of Plant Sciences* 9: 266-280

Zhang J, Gong J, Ding Y, Lu B, Wu X, Zhang Y (2010) Antibacterial activity of water-phase extracts from bamboo shavings against food spoilage microorganisms. *African Journal of Biotechnology* 9: 7710-7717

Zhang S, Zhu W, Wang B, Tang J, Chen X (2011) Secondary metabolites from the invasive *Solidago canadensis* L. accumulation in soil and contribution to inhibition of soil pathogen *Pythium ultimum*. *Applied Soil Ecology* 48: 280-286

Zhang TY, Pannell LK, Pu QL, Cai DG, Ito Y (1988) Separation of hydroxyanthraquinone derivatives extracted from rheum with analytical high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 442: 455-458

Zhang X, Thuong PT, Jin W, Su ND, Bae K, Kang SS (2005) Antioxidant Activity of Anthraquinones and Flavonoids from Flower of *Reynoutria sachalinensis*. *Archives of pharmacal research* 28: 22-27

Zhao RZ, Liu S, Zhou LL (2005) Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the Chinese herb *Polygonum cuspidatum*. *Chromatographia* 61: 311-314

Zhou L, Yun BY, Wang YJ, Xie MJ (2011) Antibacterial mechanism of emodin on *Staphylococcus aureus*. *Chin J Biochem Mol Biol* 27: 1156-1160

Capítulo 2 – artigo original

Estudo da fitotoxicidade da emodina em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Ezequias dos Santos Torres¹, Josielle Abrahão¹, Wanderley Dantas dos Santos¹, Osvaldo Ferrarese-Filho¹ e Rogério Marchiosi^{1*}

¹Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Autor para correspondência: *rmarchiosi@uem.br; +55 (44) 99824-5305

Resumo

- A emodina é uma antraquinona encontrada majoritariamente em espécies asiáticas das famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae. Apesar de suas diversas ações metabólicas como antitumoral e antioxidante serem amplamente exploradas, seu potencial herbicida tem sido minimamente estudado.
- Neste trabalho, através de duas abordagens (curto e médio prazo) nós avaliamos a fitotoxicidade da emodina em plantas de soja em hidroponia, principalmente sobre os parâmetros biométricos (comprimentos de raízes e caules) e atividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e peroxidase).
- A médio prazo (15 dias), nas plantas tratadas com emodina, observou-se uma redução nos parâmetros biométricos de massa fresca e seca de raízes, de pelo menos 20% em relação ao branco, e de ao menos 60% em relação grupo controle, similar ao que aconteceu para a massa seca das raízes. A curto prazo (72 horas), a emodina estimulou a atividade da superóxido dismutase e, os parâmetros biométricos foram melhores em relação ao grupo branco, porém inferior ao grupo controle.
- Conclui-se que a emodina apresenta potencial como herbicida natural, mas que assim como estudos demonstraram a respeito de sua capacidade antioxidante, isso pode variar a depender da metodologia utilizada, sendo necessário mais estudos para superar as problemáticas metodológicas e esclarecer os mecanismos de ação.

Palavras-chave: Ensaios enzimáticos, emodina, fitotoxicidade, soja, antioxidante.

1. Introdução

A emodina (Fig. 1) é um metabólito secundário da classe das antraquinonas, sendo identificada de acordo com a IUPAC como 1,3,8-trihidroxi-6-metilantraceno-9,10-diona (Dong et al., 2016). Esta substância pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, porém, alguns gêneros de ervas asiáticas representam o maior grupo de espécies em que a emodina é encontrada, com destaque para aqueles inseridos nas famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae (Izhaki, 2002; Hagan et al., 2013; Sanders et al., 2017).

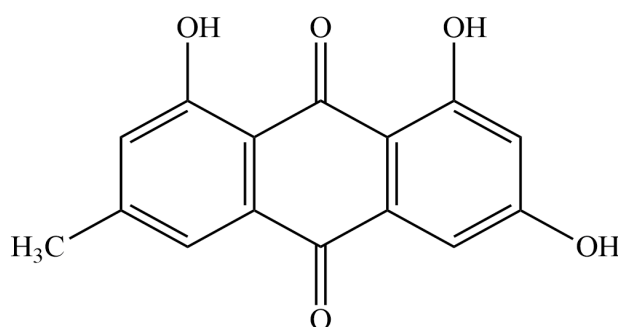


Fig. 2 Estrutura química da emodina.

Até o momento, já foram reportadas atividades antioxidante, imunossupressora, laxativa, diurética, antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, antiviral, inseticida, herbicida e antitumoral para a emodina (Izhaki, 2002 e Dong, et al., 2016). Citotoxicidade para células animais e atividade anticâncer são amplamente exploradas (vide as revisões de Srinivas et al. (2007) e Sanders et al. (2017)), embora o mecanismo de ação não seja completamente compreendido. É sabido, porém, que pode variar de acordo com o tipo de tumor, já havendo trechos genéticos considerados como promissores alvos de terapia oncogênica (Wei et al., 2013; Zu et al., 2015).

Genericamente, a emodina inibe proteínas-cinases tais como as caseínas cinases (CK) e as tirosinas cinases (Battistutta et al., 2000; Dong et al., 2016). Para células vegetais, tem sido proposto que a emodina pode ser liberada no solo em sua forma glicosilada (ou diretamente na forma aglicona) pelos rizomas e, em seguida, ser decomposta à emodina-aglicona, que é a forma capaz de inibir o crescimento de plantas vizinhas. Esta teoria foi proposta por Inoue et al. (1992) utilizando a erva *Polygonum sachalinense* como modelo.

A emodina, no entanto, é encontrada em diversas plantas de tamanhos e de regiões variados, e sua concentração máxima variante nos diferentes órgãos vegetais como caule,

semente, folha, raiz ou fruto, também contribuem para que sua ação e mecanismo tenham sofrido adaptações regionais (Tsahar et al., 2002; Farooq et al., 2013; Priya et al., 2013; Chen et al., 2014; Jeelani et al., 2017). Macías et al. (2007) relataram que assim como outras antraquinonas e substâncias pouco exploradas, a emodina possui um alto potencial para uso como substância alelopática, mas ainda faltam estudos com metodologias capazes de relacionar atividade biológica com a estrutura química, e assim entender a ação e propor modelos específicos.

Devido a sua baixa hidrofiliçidade, seu uso como substância isolada em pesquisas torna-se difícil, uma vez que a emodina pode estar presente numa solução, mas não estar biodisponível para as células, seja *in vitro* ou *in vivo*, tal qual discutido por Li et al. (2020) para estudos com células animais. Para contornar essa situação, uma das estratégias adotadas tem sido o uso de substâncias análogas, com estruturas menores e mais hidrofílicas (Romagni et al., 2004), ou ainda através de extratos contendo emodina como principal metabólito presente (Vrchotová e Šerá, 2008; Klionsky et al., 2011; Šerá, 2012).

O uso da emodina isolada como herbicida foi testado mais recentemente por Tucker Serniak (2016) usando o rabanete como planta modelo, à uma concentração de 200 mg.L⁻¹ de emodina. Além da ação herbicida, a aplicação desta antraquinona (como extrato) em plantações de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi feita de modo a avaliar a ação protetora contra a espécie de veado *Odocoileus virginianus* (Yue et al., 2018), e também contra a lagarta *Chrysodeixis includens*, uma das principais pragas deste grão (Yue et al., 2020). Em ambos casos, sendo encontrados resultados positivos da emodina como inseticida e contra herbivorismo.

A busca por alternativas aos agrotóxicos tradicionais para o controle de daninhas, assim como de insetos e outras pragas, de maneira economicamente viável e ambientalmente sustentável, é um dos principais desafios para agricultura atual (Carneiro et al., 2015), já que o uso, por vezes indiscriminado e incorreto, dos agrotóxicos químicos podem causar danos à saúde humana (Elahi et al., 2019) e ao meio ambiente (Chauhan et al., 2017).

Diante deste quadro, nós investigamos a fitotoxicidade da emodina sobre plantas de soja (*Glycine max*), considerando parâmetros biométricos tais como comprimento e biomassas fresca e seca das raízes, além dos efeitos sobre o metabolismo antioxidante através da determinação das atividades da peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), dados estes ainda escassos na literatura.

2. Material e Métodos

2.1. Testes de solubilidade e toxicidade da emodina

Foram realizados teste de solubilidade da emodina em etanol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração inicial de 1 mg.mL^{-1} . O metanol teve o menor efeito solubilizante, seguido do etanol e do DMSO. No entanto, quando efetuado um teste de toxicidade em plantas de soja nas condições de crescimento do experimento de 15 dias (descrito abaixo) utilizando somente solução nutritiva e os três solventes (controle) a 0,5% e 1%, tanto as soluções com DMSO quanto as com metanol, além da solução com etanol a 1%, levaram a morte das plantas, e por isso o etanol foi escolhido como agente solubilizante da emodina na proporção de 0,5% de volume final.

Uma solução inicial contendo emodina em etanol a $1,075 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi desenvolvida. Para facilitar no processo de solubilização em etanol, a solução foi aquecida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min por três vezes, intercaladas de agitação em vórtex durante 1 min e, posteriormente, pelo tempo necessário para total solubilização da emodina.

2.2. Procedimento gerais e cultivo das plantas (15 dias e 72 horas)

Sementes de soja (*G. max* (L.) Merrill), cv. BMX-potência, foram previamente sanitizadas em solução de NaClO a 2% durante 5 min e, em seguida, lavadas abundantemente com água deionizada. Após este procedimento, as sementes foram depositadas entre duas folhas de papel Germitest[®] CEL-060, previamente umedecidas, as quais foram enroladas e acondicionadas em tubos de PVC contendo um pequeno filme de água para a manutenção da umidade. A germinação ocorreu em câmara escura (Tecnal TE-400, Brasil) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 dias.

Para o experimento de 15 dias, após a germinação, duas plântulas foram transferidas para um sistema hidropônico contendo 80 mL de solução nutritiva contendo as formulações comerciais MAXSOL MX-21 e Nitrato de Cálcio (Jaraguá Agrícola) a pH 6,0. Os recipientes contendo as plântulas foram acondicionados em câmara para crescimento a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 2), fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) e irradiância de $400 \text{ } \mu\text{mols de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante sete dias. No oitavo dia de cultivo, umas das plantas foi descartada e a outra cultivada por mais oito dias com numa solução contendo $20 \text{ } \mu\text{M}$ emodina dissolvida em etanol a 0,5%. A solução nutritiva foi substituída a cada 48 h para

evitar a deficiência de nutrientes e para manutenção de concentração constante de emodina durante o período de cultivo. Ao final do experimento, foram determinados os comprimentos e as biomassas frescas e secas de raízes e caules, área foliar aferida através do software Easy Leaf Area (Easlon e Bloom, 2014), e massa fresca e seca das folhas. Além do índice SPAD, o qual estima o teor de clorofila, aferido com o SPAD-502 (Konica Minolta, Ramsey, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante.

Para o experimento de 72 horas, após a germinação 10 plântulas uniformes foram transferidas para o sistema experimental hidropônico contendo 80 mL de solução nutritiva comercial já acrescentada com 20 μM de emodina dissolvida em etanol a 0,5%. As mesmas condições de crescimento foram adotadas. Ao fim das 72 h, foram determinados os comprimentos e as biomassas frescas das raízes.

Ademais, em ambos experimentos, cultivos com plantas receberam apenas solução nutritiva (controle), e cultivos contendo solução nutritiva e etanol 0,5% foram realizados para monitorar os efeitos do solvente nas variáveis analisadas (branco).

2.3. Determinação de conteúdo total de proteínas e da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinação das atividades enzimáticas foi obtido um extrato bruto através da homogeneização de 1 g de raízes de soja com nitrogênio líquido e 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) contendo DTT 3,0 mM, EDTA 1,0 mM e 0,01 g de polivinilpirrolidona (PVPP) (Azevedo et al., 1998). Após centrifugação a 16.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático para medir a atividade da POD, SOD e CAT, e também para determinação do conteúdo total de proteínas.

A atividade da POD foi determinada como descrito por Dos Santos et al. (2008). O meio de reação (3 mL) continha tampão fosfato 25 mM (pH 6,8), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,58 mM e guaiacol 10 mM. A atividade da POD foi calculada usando um coeficiente de extinção molar para o tetraguaiacol de 25,5 $\text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Devi e Prasada, 1996) e os resultados expressos em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa fresca.

A atividade da CAT foi determinada por meio de espectrofotômetro modelo SPECTRUM SP 2000 UV, a 405 nm, através do consumo de H_2O_2 a partir do meio reacional (Tománkova et al., 2006). O meio de reação (1,1 mL) continha 50 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 50 μL do extrato enzimático e H_2O_2 27 mM, com os resultados expressos em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa fresca de raiz.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977), tendo como base a capacidade da enzima de converter o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), nitrobluetetrazólio (NBT) 75 μ M, L-metionina 13 mM, riboflavina 4 μ M e 20 μ L de extrato enzimático, totalizando 1,5 mL. A redução do NBT foi monitorada em espectrofotômetro a 560 nm e uma unidade de enzima (U) para SOD definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de redução de NBT. Os resultados foram expressos como $U \cdot g^{-1}$ de massa fresca de raiz.

2.4. Análise estatística

Na avaliação de atividade enzimática foram utilizados quatro sistemas ($n=4$), com cada um contendo 10 plantas para cada um dos tratamentos (controle, branco e tratamento), destacando que para este experimento foram também aferidos o tamanho e massa fresca das raízes. E para a avaliação de parâmetros biométricos gerais durante média exposição (15 dias) foi um $n = 5$, com uma planta cada, para cada tratamento.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada no pacote de software GraphPad Prism[®] (versão 6.0, GraphPad Software Inc., EUA) para testar a significância das diferenças observadas. O teste de comparação múltipla de Tukey foi aplicado aos dados de crescimento biométricos e atividade enzimática com valores de $P \leq 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Parâmetros biométricos e índice SPAD – exposição de médio prazo (15 dias)

Dentre os parâmetros biométricos avaliados (mostrados na Tabela 1 – 15 dias), massa fresca e seca das raízes foram dois dos quais houve diferença estatística também entre o grupo branco (solução nutritiva + etanol 0,5%) e o tratado (solução nutritiva + etanol 0,5% + emodina 20 μ M). Quando comparado com o controle, o tratamento com emodina reduziu as biomassas frescas e secas de raízes 72,7% e 60%, respectivamente. Quando comparado com o branco, a redução destes parâmetros foi de 27% e 20%. O tratamento com emodina também reduziu significativamente em 43,2% e 19,4% a

biomassa seca das folhas quando comparado com os tratamentos controle e branco, nesta ordem.

As biomassas frescas e secas de caules de plantas tratadas com emodina foram, em média, 8% menor do que aquelas do tratamento branco, apesar de não serem estatisticamente diferentes entre si. Similar aos resultados que o índice SPAD apresentou, ou seja, com os maiores valores no grupo controle, com uma média de 23,8. Branco e tratamento tiveram médias de 10,9 e 8,9 respectivamente, representando nessa ordem uma diminuição de 54,2% e 62,6% em relação ao grupo controle, mas sem diferença estatística entre branco e tratamento.

Tabela 1 Dados biométricos obtidos das análises de raízes, caules e folhas – 15 dias.

Grupos Analisados	Raiz			
	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Massa Fresca (g)</i>	<i>Massa Seca (g)</i>	
Controle	48,10 ± 3,50 ^a	4,66 ± 0,17 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	
Branco	21,46 ± 1,79 ^b	1,74 ± 0,12 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	
Emodina	23,76 ± 4,00 ^b	1,27 ± 0,04 ^c	0,12 ± 0,01 ^c	
	Caule			
	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Massa Fresca (g)</i>	<i>Massa Seca (g)</i>	
Controle	11,26 ± 0,33 ^a	1,16 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,005 ^a	
Branco	7,02 ± 0,51 ^b	0,57 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,004 ^b	
Emodina	7,62 ± 0,49 ^b	0,52 ± 0,03 ^b	0,10 ± 0,005 ^b	
	Folha			
	<i>Área (cm²)</i>	<i>Massa Fresca (g)</i>	<i>Massa Seca (g)</i>	<i>SPAD</i>
Controle	164,30 ± 7,39 ^a	3,14 ± 0,16 ^a	0,44 ± 0,02 ^a	23,8 ^a
Branco	62,63 ± 3,41 ^b	1,25 ± 0,51 ^b	0,31 ± 0,01 ^b	10,9 ^b
Emodina	50,54 ± 3,76 ^b	1,01 ± 0,06 ^b	0,25 ± 0,02 ^c	8,9 ^b

Tratamento controle refere-se ao cultivo apenas com solução nutritiva. No tratamento Branco as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5%. No tratamento emodina as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5% + emodina 20 µM. Os valores médios ± EPM (n = 5) marcados com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05, teste de comparação múltipla de Tukey).

3.2. Parâmetros biométricos, conteúdo total de proteínas e ensaios enzimáticos – exposição de curto prazo (72 h)

Os dados obtidos de comprimento e biomassa fresca das raízes das plantas do cultivo de 72 h estão mostrados na Figura 2a,b. Nos dois casos, o grupo controle apresentou os resultados maiores. O grupo branco apresentou os menores resultados e as plantas com emodina, numa posição intermediária entre os dois, sendo todos estatisticamente diferentes entre si.

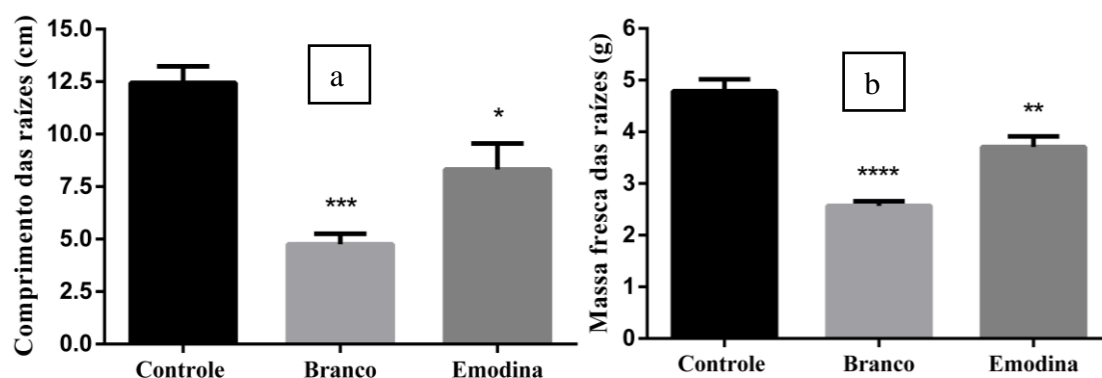


Fig. 2 (a): Comprimento das raízes; (b): Massa fresca das raízes. Os dados são referentes ao cultivo das plantas de soja em 72 horas. Tratamento controle refere-se ao cultivo apenas com solução nutritiva. No tratamento Branco as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5%. No tratamento emodina as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5% + emodina 20 μ M. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. As barras representam o Erro Padrão da Média.

O conteúdo total de proteínas e as atividades de SOD, POD e CAT estão mostradas na Tabela 2. O conteúdo total de proteínas não diferiu estatisticamente entre os grupos analisados, apesar de os grupos branco e tratamento terem apresentado maiores valores em relação ao grupo controle (6,29% e 33,71%, respectivamente). De modo similar, a atividade da POD também foi maior nas plantas dos tratamentos branco e emodina do que no tratamento controle.

Outro achado relevante foi o de que a emodina estimulou a atividade da CAT, sendo 65,21% e 33,01% maior do que nos tratamentos controle e branco. A atividade da SOD também foi estimulada pela emodina, sendo em média 54% maior comparada aos tratamentos controle e branco.

Tabela 2 Conteúdo total de proteínas e atividades da SOD, POD e CAT de raízes de plântulas de soja – 72 horas.

	Grupos analisados		
	<i>Controle</i>	<i>Branco</i>	<i>Emodina</i>
Conteúdo Total de Proteínas (mg mL ⁻¹)	1,75 ± 0,18	1,86 ± 0,08	2,34 ± 0,45
Atividade da SOD (U.g ⁻¹ de massa fresca)	0,094 ± 0,003 ^b	0,095 ± 0,012 ^b	0,146 ± 0,010 ^a
Atividade da POD (U.mg ⁻¹ de massa fresca)	2,79 ± 0,654	5,82 ± 0,845	7,22 ± 1,676
Atividade da CAT (U.mg ⁻¹ de massa fresca)	0,39 ± 0,055 ^b	0,81 ± 0,059 ^{ab}	1,21 ± 0,296 ^a

Tratamento controle refere-se ao cultivo apenas com solução nutritiva. No tratamento Branco as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5%. No tratamento emodina as plantas foram cultivadas na presença de etanol 0,5% + emodina 20 µM. Os valores médios ± EPM (n = 4) marcados com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05, teste de comparação múltipla de Tukey).

4. Discussão

A diminuição estatisticamente significativa demonstrada para massa fresca e seca das raízes, assim como para a massa seca das folhas do grupo tratado com emodina, referente ao experimento de 15 dias mostrados na Tabela 1, demonstram a fitotoxicidade da emodina sobre as plantas de soja. Estes novos dados acrescentam sobre os indícios do potencial uso da emodina como herbicida natural, como levantado por Singh et al. (2010) tratando-se de antraquinonas.

O comprimento das raízes das plantas submetidas a emodina a 5,4 mg.L⁻¹ (20 µM), se comparado apenas com o grupo controle, apresentou uma diminuição de 50,6%. Inoue et al. (1992) encontraram uma redução no crescimento de raízes de alface (*Lactuca sativa*) de aproximadamente 80% trabalhando com emodina a 50 mg.L⁻¹, valor bem superior à concentração usada em nosso estudo. Já na concentração de 100 mg.L⁻¹ a emodina inibiu em torno 90% o crescimento das raízes tanto de alface, como de amaranto verde (*Amaranthus viridis*) e grama timóteo (*Phleum pratense*) (Inoue et al., 1992).

Hasan (1998) testou os efeitos fitotóxicos da emodina em milho e girassol, e em concentrações de 100 mg.L⁻¹, chegou à uma redução de crescimento de raízes de 71,8% e 70,3%. No entanto, os estudos de Inoue *et al.* (1992) e Hasan (1998) desconsideraram a interferência do solvente usado por eles para solubilizar a emodina, usando um controle livre, de apenas água e/ou solução nutritiva, e como visto nos dados do presente estudo, não há diferença significativa entre o tratamento com emodina e o grupo tratado apenas com solução nutritiva e etanol a 0,5% para crescimento de raízes, apontando um possível enviesamento de dados sem essas considerações.

Quando Fan *et al.* (2010) testaram a emodina a 500 mg.L⁻¹ e utilizaram um controle com o solvente (metanol) utilizado para solubilizar a emodina, apesar de uma diminuição de aproximadamente 30% no tamanho das radículas de agrião (*Lepidium sativum*), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Tucker-Serniak (2016) também utilizou o metanol para diluir a emodina, encontrando uma redução significativa de 16,2% no tamanho das raízes de rabanete (*Raphanus sativus*) aplicando uma concentração de emodina de 200 mg.L⁻¹.

O tempo é também um fator que precisa ser considerado nas análises. Os trabalhos até aqui citados se utilizaram de espécies vegetais diferentes e com tempos de exposição da emodina sobre as plantas que variaram de 36 h até 14 dias (Inoue *et al.*, 1992; Hasan, 1998; Fan *et al.*, 2010; Tucker-Serniak, 2016). Quando consideramos o comprimento e massa fresca de raízes das plantas do experimento de 72 h (Fig. 2), é notável que apesar do tratamento com emodina apresentar dados biométricos piores em relação ao grupo controle, eles ainda são melhores do que os resultados do grupo branco.

O comprimento das raízes das plantas do grupo branco diminuiu em 61,85%, e do grupo com emodina em 33,13%, em relação ao controle. O peso da massa fresca das raízes apresentou resultado parecido, com redução de 46,41% e 22,59% dos grupos branco e tratado, respectivamente. Estes resultados do experimento em curto prazo, indicam um padrão de reação diferente das plantas de soja expostas à emodina por mais tempo, e que foram expostas quando estavam mais desenvolvidas (Tabela 1).

No experimento de 72 h, a emodina melhorou o desempenho das plantas quando comparada ao grupo exposto ao etanol em 75,26 % em relação ao tamanho das raízes, e em 44,45% sobre a biomassa fresca das raízes. Sendo assim, a emodina neste experimento a curto prazo, e de exposição após 3 dias de germinação, desempenhou um papel protetivo as plantas no que se refere a exposição ao etanol, uma substância que em níveis anormais é tóxica afetando o crescimento vegetal (Lambers *et al.*, 2008).

Já os demais dados biométricos como área foliar e comprimento de caule e também o índice SPAD, apesar de todos serem bem menores do que os encontrados no grupo controle, eles não diferiram do grupo de plantas com etanol, sendo, portanto, imprudente afirmar que a redução encontrada seja exclusivamente um efeito da ação da emodina. Toker-Serniak (2016), a qual mediu comprimento e largura de folhas em seu trabalho, também não encontrou diferença significativa em relação ao controle.

Vários trabalhos, através de diferentes metodologias, têm descrito o potencial da emodina como agente antioxidante (Yen et al., 1998; Yen et al., 2000; Martínez e Benito, 2005; Marković e Manojlović, 2009). Porém, análises da atividade enzimática do sistema antioxidante de plantas ainda não haviam sido descritos.

No presente trabalho foi demonstrado que apesar de um aumento na concentração de proteínas totais vistos nos grupos branco e tratamento, essa diferença não foi significativa. De modo similar se deu a atividade da POD, mesmo com valores variando em mais de 150%, como o grupo controle e o grupo tratado com emodina.

Alguns trabalhos relatam uma redução na atividade da SOD para estudos *in vitro* em células animais humanas e não humanas quando expostas a emodina, sugerindo um efeito oxidante (Qu et al., 2013; Cui et al., 2014). Já a revisão de Li et al. (2020) traz dados contrários, com aumento na atividade desta enzima, e relacionando este aumento a capacidade da emodina de gerar uma resposta protetora contra estresse oxidativo.

Plantas expostas a estresses bióticos ou abióticos apresentam aumento nas taxas de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como uma resposta de defesa, as plantas podem estimular a atividade de SOD, CAT e POD com objetivo de eliminar ROS. A atividade da SOD converte o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto POD e CAT detoxificam H_2O_2 em água, evitando o estresse oxidativo (Bhatla, 2018). Nos dados encontrados por nós sobre o aumento da atividade da SOD no grupo tratado com emodina, junto aos parâmetros biométricos do experimento de 72 h, apontam para uma função protetora, ação antioxidante, dentro dessas condições descritas.

Em seu trabalho com a espécie fúngica *Aspergillus ochraceus*, Lv (2014) relacionou a concentração de emodina presente no produto fermentativo de duas linhagens desta espécie com a atividade de SOD, CAT e quantidade de ROS. Sua análise sugere que a não alteração da SOD e aumento na CAT, é um indicativo de que a emodina está sendo capaz de atuar no lugar da SOD na neutralização de ROS gerando H_2O_2 , e este sendo eliminado pela ação da CAT. Apesar de sua metodologia não utilizar emodina pura e assim desconsiderar possíveis efeitos sinérgicos (Tian e Hua, 2005; Bathia et al.,

2020), além de fazer sua análise em uma espécie de fungo e não em uma espécie vegetal (uma dicotiledônea no caso da soja), sua análise também aponta para a emodina possuindo ação antioxidante.

Em nosso estudo, houve também um aumento na atividade da CAT nos grupos com etanol e emodina, sendo o grupo com emodina, o com maior atividade entre todos. Indicando que parte dos efeitos tóxicos do etanol sobre as plantas de soja, foram reduzidos pela ação da emodina, a qual foi capaz de aumentar o efeito de todas as enzimas do sistema antioxidante aqui testadas, o que pode ser visto nos dados nos resultados dos dados biométricos deste experimento. Apesar disso, vale ressaltar que os dados do experimento de 15 dias, com exposição de médio prazo à emodina, diferem destes resultados, revelando uma atividade diferente no metabolismo das plantas de soja, onde a emodina passa a ter efeitos deletérios, quando em outras condições de exposição,

Atualmente, sabe-se que a emodina é uma molécula com atividade antioxidante, mas que isso pode ser invertido a depender da dose, espécie analisada e metodologia aplicada no estudo (Rossi et al., 2020; Ya et al., 2020). Em adição à problemática da alta hidrofobicidade da emodina já mencionada, outro fator crucial neste tipo de análise é que a emodina precisa estar biodisponível para as células a serem analisadas, e estar solúvel não necessariamente denota isto (Li et al., 2020).

5. Conclusão

Os novos dados aqui apresentados do experimento de 15 dias sobre a fitotoxicidade da emodina sobre plantas de soja, uma importante espécie comercial, corroboram alguns dos estudos sobre a ação alelopática desta antraquinona. Traz também uma outra perspectiva, um estudo in vivo vegetal, sobre a ação antioxidante da emodina e que com os dados biométricos deste ensaio, apontam para uma ação protetora quando disponibilizada em outras condições das do experimento de maior tempo. Estes resultados se relacionam e representam mais um degrau para o entendimento da ação da emodina em plantas, e toda sua complexidade metodológica para aplicação, mas que uma vez esclarecida, poderá contribuir para o uso da emodina não somente na agricultura, como também em diversas áreas como na saúde humana.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PBC da Universidade Estadual de Maringá, espaço onde toda a pesquisa se desenvolveu. Ao CNPq, órgão responsável por financiar este estudo. Todos os autores declaram que não possuem conflitos de interesse.

Contribuição de autor

EST realizou todos os experimentos e participou da escrita e análise dos dados. JA, RM e EST foram os responsáveis pela concepção do projeto. WDS, OFF e RM contribuíram para a edição do manuscrito e análise final dos resultados.

Disponibilidade dos dados

Os dados da pesquisa estão depositados no repositório público da Universidade Estadual de Maringá – UEM, local onde a pesquisa foi realizada, e podem ser obtidos de maneira online.

Referências bibliográficas

- Azevedo RAD, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. 1998.** Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* **104**: 280-292.
- Battistutta R, Sarno S, De Moliner E, Papinutto E, Zanotti G, Pinna LA. 2000.** The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 29618-29622.
- Bhatia A, Arora S, Nagpal A, Singh B. 2020.** Screening of rhizomes of *Rheum emodi* Wall. Ex. Meissen for antimutagenic potential employing Ames assay. *The Nucleus* **63**: 167-177.
- Bhatla SC. 2018.** Abiotic Stress. In: Bhatla SC, Lal MA, eds. *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore.

Carneiro FF. 2015. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.* EPSJV/Expressão Popular.

Chauhan BS, Matloob A, Mahajan G, Aslam F, Florentine SK, Jha P. 2017. Emerging challenges and opportunities for education and research in weed science. *Frontiers in plant science* **8**: 1537.

Chen T, Liu Y, Zou D, Chen C, You J, Zhou G, Sun J, Li Y. 2014. Application of an efficient strategy based on liquid–liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum*. *Journal of separation science* **37**: 165-170.

Cui YT, Liu B, Xie J, Xu P, Habte-Tsion HM, Zhang YY. 2014. The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish & shellfish immunology* **38**: 74-79.

Devi SR, Prasad MNV. 1996. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biologia Plantarum* **38**: 387-395.

Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L, Huyiligeqi, Ni J. 2016. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research* **30**: 1207-1218.

Dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O. 2008. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 1230-1241.

Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. 2016. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products* **94**: 812-833.

Easlon HM, Bloom AJ. 2014. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in plant sciences*. doi: 10.3732/apps.1400033.

Elahi E, Weijun C, Zhang H, Nazeer M. 2019. Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land use policy* **83**: 461-474.

Fan P, Hostettmann K, Lou H. 2010. Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (Polygonaceae). *Chemoecology* **20**: 223-227.

Farooq U, Pandith SA, Saggoo MIS, Lattoo SK. 2013. Altitudinal variability in anthraquinone constituents from novel cytotypes of *Rumex nepalensis* Spreng - a high

value medicinal herb of North Western Himalayas. *Industrial Crops and Products* **50**: 112-117.

Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* **59**: 309-314.

Hagan DL, Jose S, Lin CH. 2013. Allelopathic exudates of cogongrass (*Imperata cylindrica*): implications for the performance of native pine savanna plant species in the southeastern US. *Journal of chemical ecology* **39**: 312-322.

Hasan HAH. 1998. Studies on toxigenic fungi in roasted foodstuff (Salted seed) and halotolerant activity of emodin-producing *Aspergillus wentii*. *Folia microbiologica* **43**: 383-391.

Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J. 1992. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae) *Journal of Chemical Ecology* **18**: 1833-1840.

Izhaki I. 2002. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist* **155**: 205-217.

Jeelani SM, Farooq U, Gupta AP, Lattoo SK. 2017. Phytochemical evaluation of major bioactive compounds in different cytotypes of five species of *Rumex* L. *Industrial Crops and Products* **109**: 897-904.

Klionsky SM, Amatangelo KL, Waller DM. 2011. Above-and belowground impacts of European buckthorn (*Rhamnus cathartica*) on four native forbs. *Restoration Ecology* **19**: 728-737.

Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. 2008. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York, New York.

Li Q, Gao J, Pang X. 2020. Molecular Mechanism of Emodin Action: as an anti-cardiovascular disease drug. *Frontiers in Pharmacology* **11**: 1363.

Lv P. 2014. Relationship Between Reactive Oxygen Species and Emodin Production in *Aspergillus ochraceus*. In: Li S, Jin Q, Jiang X, Park JJ, eds. *Frontier and Future Development of Information Technology in Medicine and Education*. Springer, Dordrecht, 2337-2343.

Macías FA, Molinillo JM, Varela RM, Galindo JC. 2007. Allelopathy—a natural alternative for weed control. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **63**: 327-348.

Marković ZS, Manojlović NT. 2009. DFT study on the reactivity of OH groups in emodin: structural and electronic features of emodin radicals. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* **140**: 1311

- Martínez MJA, Benito PB. 2005.** Biological activity of quinones. In: Atta-ur Raman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 303–366.
- Priya ES, Selvan PS, Prakash PP. 2013.** HPTLC method development and validation for simultaneous analysis of Emodin and Chrysophanol in *Cassia tora* Linn methanolic extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **36**: 2525-2533.
- Qu K, Shen NY, Xu XS, Su HB, Wei JC, Tai MH, Meng FD, Zhou L, Zhang YL, Liu C. 2013.** Emodin induces human T cell apoptosis in vitro by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica* **34**: 1217-1228.
- Romagni JG, Rosell RC, Nanayakkara NPD, Dayan FE. 2004.** Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. In: Macías FA, Galindo JC, Molinillo JM, eds. *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. CRC Press, 13-33.
- Rossi M, Wen K, Caruso F, Belli S. 2020.** Emodin scavenging of superoxide radical includes π - π interaction. X-ray crystal structure, hydrodynamic voltammetry and theoretical studies. *Antioxidants* **9**: 194.
- Sanders B, Ray AM, Goldberg S, Clark T, McDaniel HR, Atlas SE, Farooqi A, Konefal J, Lages LC, Lopez J et al. 2017.** Anti-cancer effects of aloe-emodin: A systematic review. *Journal of clinical and translational research* **3**: 283.
- Šerá B. 2012.** Effects of soil substrate contaminated by knotweed leaves on seed development. *Polish journal of environmental studies* **21**.
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK. 2003.** Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical reviews in plant sciences* **22**: 239-311.
- Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan P, Srinivas P. 2007.** Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal research reviews* **27**: 591-608.
- Tian B, Hua Y. 2005.** Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chemistry* **91**: 413-418.
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A. 2006.** Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon spp.* and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 22-32.
- Tsahar E, Friedman J, Izhaki I. 2002.** Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin, in *Rhamnus alaternus* fruit pulp. *Oikos* **99**: 290-299.

- Tucker Serniak L. 2016.** Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. *Weed research* **56**: 97-101.
- Vrchotová N, Šerá B. 2008.** Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. *Plant Soil Environ* **54**: 301-303.
- Wei WT, Lin SZ, Liu DL, Wang ZH. 2013.** The distinct mechanisms of the antitumor activity of emodin in different types of cancer. *Oncology reports* **30**: 2555-2562.
- Ya CUI, Liu-Jing CHEN, Huang T, Jian-Qiong YING, Juan LI. 2020.** The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chinese Journal of Natural Medicines* **18**: 425-435.
- Yen GC, Chen HW, Duh PD. 1998.** Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 820-824.
- Yen GC, Duh PD, Chuang DY. 2000.** Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food chemistry* **70**: 437-441.
- Yue Z, Krishnan N, Tseng TM. 2020.** Antifeedant Effect of Sickle Extract on Soybean Looper *Chrysodeixis includes* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* **65**: 293-300.
- Yue Z, Tseng TM, Lashley M. 2018.** Characterization and Deer-Repellent Property of Chrysophanol and Emodin from Sicklepod Weed. *American Journal of Plant Sciences* **9**: 266-280.
- Zu C, Zhang M, Xue H, Cai X, Zhao L, He A, Qin G, Yang C, Zheng X. 2015.** Emodin induces apoptosis of human breast cancer cells by modulating the expression of apoptosis-related genes. *Oncology letters* **10**: 2919-2924.