

**KARLA MARTINS FERREIRA OLIVA**

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS DE *Caryocar  
brasiliense* Camb. SOBRE A GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM *Bidens pilosa*,  
*Glycine max* E *Zea mays***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48a  
2006  
bioquímicos  
mays /

Oliva, Karla Martins Ferreira, 1976-  
Atividade alelopática de extratos de *Caryocar Brasiliense*  
Camb. sobre a germinação, crescimento e aspectos  
e fisiológicos em *Bidens pisola*, *Glycine max* e *Zea*

Karla Martins Ferreira Oliva. – Viçosa : UFV, 2006.  
xviii, 62f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marco Antonio Oliva Cano  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 54-62.

1. Fisiologia vegetal. 2. Ecofisiologia vegetal. 3. Agentes  
alelopáticos. 4. *Caryocar Brasiliense*. 5. Cromatografia a gás.  
6. Espectrômetro. 7. Espectrometria de massa. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

**KARLA MARTINS FERREIRA OLIVA**

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS DE *Caryocar  
brasilense* Camb. SOBRE A GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM *Bidens pilosa*,  
*Glycine max* E *Zea mays***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2006.

---

Prof. José Cambraia  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Marília Contin Ventrella  
(Conselheira)

---

Prof. Manuel Gonzalo Hernandez Terrones

---

Prof. Francisco Affonso Ferreira

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva  
(Presidente da banca)

**DEDICO**

*Ao meu esposo,  
Giancarlo Oliva Godoy.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio logístico para execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudo.

Ao professor e orientador, Marco Antonio Oliva Cano, pelos ensinamentos e pela confiança a mim depositada para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, João Batista e Maria da Glória, que sempre estiveram ao meu lado, pelo incentivo e exemplo de vida.

Ao meu esposo Giancarlo Oliva Godoy, pelo companheirismo, amor e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao professor Manuel Gonzalo Hernandez Terrones, Universidade Federal de Uberlândia, pelos ensinamentos em produtos naturais e pela valiosa contribuição na execução deste trabalho.

Ao professor Blas Lotina-Hennsen, Universidade Autônoma do México, pelas idéias científicas e o incentivo no desenvolvimento do projeto.

Aos professores José Cambraia, Marília Contin Ventrella, Marco Aurélio Pedron e Silva e Francisco Affonso Ferreira pelas sugestões e correções.

Aos amigos e funcionários da UCP, Kacilda, Izabella, Alan, Fábio, Rogerinho, Eduardo, Cláudio, Rogério Gomide e João Bosco, que muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos André Luís Duarte Goneli e Breno Lourenzzo por me “socorrerem” sempre nos momentos de desespero.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal e profissional, os meus eternos agradecimentos!

E, principalmente, a Deus, por iluminar o meu caminho e, sempre guiar os meus passos!

Muito obrigada!!!

## **BIOGRAFIA**

KARLA MARTINS FERREIRA OLIVA, filha de João Batista Ferreira e Maria da Glória Martins Ferreira, nasceu em 26 de julho de 1976 na cidade de Muriaé, Minas Gerais.

Em 2000, graduou-se pela Universidade Federal de Juiz de Fora – MG (UFJF), em Ciências Biológicas nas Modalidades de Licenciatura Plena e Bacharelado.

No mesmo ano, iniciou-se no Mestrado em Botânica do Departamento de Biologia Vegetal, na área de pesquisa em Anatomia Vegetal, pela Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV), sendo este concluído em março de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa – MG, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
GLOSSÁRIO.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2- OBJETIVOS.....	03
3- MATERIAL VEGETAL E METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	04
Preparo dos extratos brutos.....	04
Fracionamento do extrato bruto.....	04
<b>CAPÍTULO 1: Atividade alelopática de extrato metanólico bruto e fracionado de <i>Caryocar brasiliense</i> na germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i>, <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i>.....</b>	<b>06</b>
1.1- Introdução.....	06
1.2- Material e métodos.....	07

Experimento I: Seleção do extrato ativo de <i>Caryocar brasiliense</i> mediante a avaliação da germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> .....	07
Experimento II: Avaliação dos efeitos do EMF sobre a germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	08
Experimento III: Seleção da fração mais ativa do EMF mediante a avaliação dos efeitos na germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	09
1.3- Resultados e discussão.....	09
Experimento I: Efeitos na germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> submetidas aos extratos de <i>Caryocar brasiliense</i> e seleção do extrato ativo.....	09
Experimento II: Efeitos de EMF na germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	14
Experimento III: Efeitos de todas as frações de EMF sobre a germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> e seleção da fração mais ativa.....	18
1.4- Conclusões.....	27
<b>CAPÍTULO 2: Respostas fisiológicas e bioquímicas de <i>Bidens pilosa</i>, <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> submetidas ao extrato metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> e fração diclorometano.....</b>	<b>28</b>
2.1- Introdução.....	28
2.2- Material e métodos.....	29
Experimento I: Avaliação dos efeitos do extrato bruto metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> (EMF) sobre as trocas gasosas, teores de pigmentos e fluorescência da clorofila <i>a</i> em <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	29
Experimento II: Estresse oxidativo em plantas de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> submetidas à fração diclorometano.....	30
2.3- Resultados e discussão.....	32

Experimento I: Efeitos do extrato bruto metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> (EMF) sobre as trocas gasosas, teores de pigmentos e fluorescência da clorofila a em <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	32
Experimento II: Estresse oxidativo em plantas de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> submetidas à fração diclorometano.....	39
2.4- Conclusões.....	44
<b>CAPÍTULO 3: Identificação química da fração diclorometano do extrato metanólico de <i>Caryocar brasiliense</i>.....</b>	<b>45</b>
3.1- Introdução.....	45
3.2- Material e métodos.....	46
3.3- Resultados e discussão.....	46
3.4- Conclusões.....	52
4- CONCLUSÕES GERAIS.....	53
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1:</b> Atividade alelopática de extrato metanólico bruto e fracionado de <i>Caryocar brasiliense</i> na germinação e crescimento inicial de <i>Bidens pilosa</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> .....	06
<b>Figura 1.1:</b> Efeito dos extratos metanólicos de <i>C. brasiliense</i> na inibição da germinação (%) de <i>B. pilosa</i> . Equação e R <sup>2</sup> referentes à taxa de germinação de <i>B. pilosa</i> submetidos aos extratos metanólicos de <i>C. brasiliense</i> .....	11
<b>Figura 1.2:</b> Efeito dos extratos metanólicos de <i>C. brasiliense</i> na velocidade de germinação (IVG) de <i>B. pilosa</i> .....	12
<b>Figura 1.3:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na inibição da germinação (%) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> . Equação, R <sup>2</sup> referentes à taxa de germinação de cada espécie submetidas ao EMF.....	15
<b>Figura 1.4:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na velocidade de germinação (IVG) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	16
<b>Figura 1.5:</b> Efeito das frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na inibição da germinação (%) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	20

<b>Tabela 1.1 :</b> Efeito dos tratamentos-controle na inibição da germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), altura e matéria seca total em <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	10
<b>Tabela 1.2:</b> Efeito dos extratos metanólicos da folha (EMF), caule (EMC) e raiz (EMR) de <i>C. brasiliense</i> na altura das plântulas e na matéria seca total de <i>B. pilosa</i> .....	13
<b>Tabela 1.3:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na altura das plântulas e matéria seca total de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	17
<b>Tabela 1.4:</b> Equação, R <sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de <i>B. pilosa</i> submetida às frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF).....	21
<b>Tabela 1.5:</b> Equação, R <sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de <i>G. max</i> submetida às frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF).....	21
<b>Tabela 1.6:</b> Equação, R <sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de <i>Z. mays</i> submetida às frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF).....	22
<b>Tabela 1.7 :</b> Efeito das frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na velocidade de germinação (IVG) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	23
<b>Tabela 1.8:</b> Efeito das frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) sobre a altura das plântulas (mm) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	24
<b>Tabela 1.9:</b> Efeito das frações do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) sobre a matéria seca total (g) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	25
<b>CAPÍTULO 2: Respostas fisiológicas e bioquímicas de <i>Bidens pilosa</i>, <i>Glycine max</i> e <i>Zea mays</i> submetidas ao extrato metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> e fração diclorometano.....</b>	28
<b>Figura 2.1:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na fotossíntese (A), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E) e relação	

Ci/Ca de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	34
<b>Figura 2.2:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) no teor de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> e conteúdo de carotenóides de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	35
<b>Figura 2.3:</b> Efeito do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na fluorescência da clorofila “a” ( $F_v/F_m$ ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	36
<b>Figura 2.4:</b> Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na atividade de peroxidase, catalase e superóxido dismutase nas espécies de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	41
<b>Figura 2.5:</b> Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na peroxidação de lipídeos nas espécies de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	42
<b>Figura 2.6:</b> Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de <i>C. brasiliense</i> (EMF) na permeabilidade de membrana nas espécies de <i>B. pilosa</i> , <i>G. max</i> e <i>Z. mays</i> .....	43
<b>CAPÍTULO 3: Identificação química da fração diclorometano do extrato metanólico de <i>Caryocar brasiliense</i></b> .....	45
<b>Figura 3.1:</b> Cromatograma do extrato metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> (EMF) obtido após fracionamento cromatográfico usando solvente diclorometano.....	47
<b>Figura 3.2:</b> Hexadecanoato de metila (palmitato de metila). Espectro de massas do componente 1 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do palmitato de metila (padrão).....	48
<b>Figura 3.3:</b> Ácido hexadecanóico (ácido palmítico). Espectro de massas do componente 2 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do ácido palmítico (padrão).....	49
<b>Figura 3.4:</b> ( <i>E</i> )-octadec-9-enoato de metila (elaidato de metila). Espectro de massas do componente 3 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do elaidato de metila (padrão).....	49

<b>Figura 3.5:</b> ( <i>E</i> )-3,7,11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol ( <i>trans</i> -fitol). Espectro de massas do componente 4 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do <i>trans</i> -fitol (padrão).....	50
<b>Figura 3.6:</b> Octadecanoato de metila (estearato de metila). Espectro de massas do componente 5 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do estearato de metila (padrão).....	50
<b>Figura 3.7:</b> Espectro infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) do extrato da fração diclorometano.....	51
<b>Tabela 3.1:</b> Compostos identificados na fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de <i>Caryocar brasiliense</i> (EMF).....	47

## GLOSSÁRIO

**ACT:** fração acetato de etila do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

**CG-EM:** cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa;

**CLAE:** cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**DAE:** dias após a emergência

**DCM:** fração diclorometano do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

**EM:** espectrômetro de massa

**EMC:** extrato metanólico do caule de *Caryocar brasiliense*

**EMF:** extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

**EMR:** extrato metanólico da raiz de *Caryocar brasiliense*

**IVG:** Índice de Velocidade de Germinação

**IVTF:** espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier

**L<sub>50</sub>:** dose-resposta obtida para inibir 50% da germinação

**ML:** fração metanol do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

**MST:** massa seca total

**RMN:** ressonância magnética nuclear

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**A:** fotossíntese

**g<sub>s</sub>:** condutância estomática

**E:** transpiração

**ETR:** taxa de transporte de elétrons

**F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>:** rendimento quântico máximo do PS II

**Ci/Ca:** relação CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> externo

**PSI:** fotossistema 1

**PSII:** fotossistema 2

**EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético

**PMSF:** fluoreto de fenilmetilsulfônico

**PVPP:** polivinilpolipirrolidina

**POX:** peroxidase

**CAT:** catalase

**SOD:** superóxido dismutase

**NBT:** azul de p-nitro tetrazólio

**TCA:** ácido tricloacético

**MDA:** malonaldeído

**EROs:** espécies reativas de oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** radical superóxido

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HO<sup>•</sup>:** radical hidroxila

**O<sub>2</sub>H<sup>•</sup>:** radical peridroxil

**TBA:** ácido tiobarbitúrico

**ACT/ML 1:1:** fração acetato de etila/metanol 1:1 do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

**ACT/ML 7:3:** fração acetato de etila/metanol 7:3 do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*

## RESUMO

OLIVA, Karla Martins Ferreira, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Atividade alelopática de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre a germinação, crescimento e aspectos bioquímicos e fisiológicos em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Co-Orientadores: José Cambraia e Marília Contin Ventrella.

Com o intuito de verificar a atividade alelopática dos extratos metanólicos e frações de *Caryocar brasiliense*, experimentos de germinação e de crescimento inicial, assim como avaliações bioquímicas e fisiológicas foram realizados em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*. Testes cromatográficos foram realizados a fim de identificar as substâncias químicas presentes em *C. brasiliense*. Através de testes germinativos e de crescimento inicial realizados em *B. pilosa* com extratos metanólicos da folha, caule e raiz de *C. brasiliense*, foi possível selecionar o extrato com maior atividade inibitória dos parâmetros analisados. Uma vez selecionado o extrato metanólico da folha (EMF) iniciou-se o fracionamento do extrato com os seguintes solventes extratores: diclorometano, acetato de etila, metanol, acetato de etila/metanol 1:1 e acetato de etila/metanol 7:3. As concentrações utilizadas nos experimentos com o EMF foram 0, 1000, 2500 e 5000 ppm, enquanto que para as frações foram utilizadas 0 e 5000 ppm. A partir da seleção do extrato e do seu fracionamento, deu-se início a novos testes germinativos e de crescimento inicial em *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Através dos resultados obtidos, pôde-se verificar que houve maior inibição da germinação e do crescimento inicial em *B. pilosa* e *Z. mays*, sendo que em *G. max*, poucas diferenças foram observadas nessas variáveis. Os

mesmos testes foram realizados nessas espécies com as frações do EMF, a fim de selecionar a fração mais ativa. Através dos resultados obtidos, pôde-se verificar que *B. pilosa* e *Z. mays* sofreram maiores efeitos na germinação e no crescimento inicial com fração diclorometano (DCM), enquanto que em *G. max*, diferenças significativas não foram observadas em nenhuma das frações do extrato. Em seguida, deu-se início aos experimentos com trocas gasosas, teores de pigmentos, emissão da fluorescência da clorofila *a* com o EMF e, análise enzimática, peroxidação lipídica e permeabilidade de membrana com a fração DCM nas espécies estudadas. Pôde-se verificar que o EMF apresentou maiores efeitos na fisiologia de *B. pilosa* e *Z. mays*, afetando as trocas gasosas, os teores de pigmentos e a emissão da fluorescência da clorofila *a*, enquanto que *G. max* não apresentou diferenças significativas. As alterações nas propriedades fisiológicas de *B. pilosa* e *Z. mays* ocasionaram um estresse oxidativo, a ponto de afetar a atividade de enzimas antioxidativas como peroxidase, catalase e superóxido dismutase. A produção de MDA aumentou em *B. pilosa* e *Z. mays*, demonstrando ter havido uma peroxidação lipídica ocasionado pelas substâncias presentes na fração DCM. A permeabilidade de membrana também foi alterada nessas duas espécies, com maior extravasamento de eletrólitos. As substâncias presentes na fração DCM não induziram um estresse oxidativo em *G. max*, assim como não ocasionaram a peroxidação lipídica e alteração na permeabilidade de membrana. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa comprovou a presença de substâncias componentes da classe de óleos essenciais na fração diclorometano e, a confirmação de grupos funcionais foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Dessa forma, pode-se concluir que *C. brasiliense* apresentou substâncias como o palmitato de metila, ácido palmítico, elaidato de metila, álcool insaturado trans-fitol e estearato de metila, que provavelmente, foram capazes de causar efeitos na germinação, no crescimento inicial e na fisiologia e bioquímica de *B. pilosa* e *Z. mays*. *G. max* apresentou maior tolerância às substâncias químicas presentes no EMF e na fração DCM.

## ABSTRACT

OLIVA, Karla Martins Ferreira, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August, 2006. **Allelopathic activity of extracts of *Caryocar brasiliense* Camb. on the germination, growth and biochemical and physiologic aspects in *Bidens pilosa*, *Glycine max* and *Zea mays*.** Adviser: Marco Antonio Oliva Cano. Co-Advisers: José Cambraia and Marília Contin Ventrella.

In order to investigate the allelopathic potential of methanolic extracts and fractions of *Caryocar brasiliense* a set of experiments, including germination, initial growth, biochemical and physiological evaluations were carried out on *Bidens pilosa*, *Glycine max* and *Zea Mays*. Chromatographic tests were made to identify the chemical substances in *C. brasiliense*. Leaves methanolic extracts (LME), stem (SME) and root (RME) of this specie were used for *B. pilosa* germination and initial growth tests, allowing a selection of the most effective inhibitory extract. Once the extract was selected (LME) its fragmentation was done using the following solvents: dichloromethane, ethyl acetate, methanol, ethyl acetate/methanol 1:1 and ethyl acetate/methanol 7:3. On the previous experiments, the LME concentrations used were 0, 1000, 2500 and 5000 ppm, while only the 0 and 5000 ppm of the fractions used. After the extract initial selection and its fragmentation, new germination and initial growth experiments were realized, this time using *B. pilosa*, *G. max* and *Z. mays*. The experiments results showed that the germination and the initial growth were only notable affected on *B. pilosa* and *Z. mays*. In order to select the most active fraction of LME, the same tests with the same species, were performed. Again, the obtained results showed that *B. pilosa* and *Z. mays* were the most sensitive

species especially when the applied fraction was the dichloromethane fraction (DCM). *G. max* showed no significant responses to any the extract fractions. Afterwards new experiments were conducted using a different set of parameters to evaluate the effects of the fractions, respectively gas exchange, pigment concentration, *a*-chlorophyll fluorescence for the LME and enzymatic activity, lipid peroxidation and membrane permeability for the DCM. It was verified that the LME caused the most negative physiological effects on *B. pilosa* and *Z. mays* rather than on *G. max*. The *B. pilosa* and *Z. mays* physiological traits modification lead in an oxidative stress in a such degree that the activity of antioxidant enzymes, as peroxidase, catalase and superoxide dismutase, were equally affected. The MDA production increased in *B. pilosa* and *Z. mays* probably due to the lipid peroxidation caused by the DCM fraction. The membrane permeability of these two species was also affected displaying a greater electrolyte leakage. On the other hand, no oxidative stress, lipid peroxidation or membrane permeability alterations were observed in *G. max* treated with the DCM fraction. Gas chromatography/mass spectroscopy reassures the essential class oils component substances presence in the dichloromethane fraction. The functional groups were confirmed by infrared spectroscopy modified from Fourier. The gathered results lead to the conclusion that *C. brasiliense* has substances methyl palmitate, acid palmitic, methyl elaidate, insaturated alcohol *trans*-phytol and methyl estearate. Those substances were able to interfere with the germination, initial growth, biochemical and physiological of *B. pilosa* and *Z. mays*. However, in this study, *G. max* showed tolerance to both LME and DCM fraction.

## 1-INTRODUÇÃO GERAL

As plantas daninhas afetam a produção das culturas pela interferência sobre a produtividade primária, pelos danos na colheita e pela depreciação da qualidade do produto, contaminando com suas sementes e impurezas (Ferreira 1998; Rizzardi *et al.* 2003).

Nos últimos anos, estudos fisiológicos e bioquímicos têm avaliado a ação de diversos princípios ativos, extraídos de material vegetal e, posteriormente sintetizados, sobre o controle das plantas daninhas (Ferreira 1998; Macías *et al.* 1999; Vischetti & Esposito 1999; Macías *et al.* 2000 a,b; Barbosa *et al.* 2002). O controle de espécies invasoras, mediante a aplicação de substâncias com poder alelopático, pode ter uma importância estratégica pela sua atuação seletiva e pelo baixo poder residual (Anaya 1999; Chou 1999; Rizvi *et al.* 1999).

Diversas pesquisas têm direcionado seus objetivos para a proteção do meio ambiente contra os impactos ecológicos causados pela aplicação de herbicidas, fungicidas e inseticidas sintéticos comerciais, resultando em maior produtividade de culturas economicamente importantes (Ferreira 1998; Macías *et al.* 1999; Vischetti & Esposito 1999; Macías *et al.* 2000 a,b). O uso de herbicidas comerciais tem causado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, a vida silvestre e os alimentos da dieta humana (Souza Filho *et al.* 2005).

Aleloquímicos têm sido empregados como ferramentas no controle de plantas daninhas em diversas culturas. Entre os mais conhecidos encontram-se os derivados fenólicos, taninos, flavonóides, quinonas, terpenóides, alcalóides, poliacetilenos e esteróides (Rice 1984; Inderjit 1996; Mizutani 1999; King-Diaz *et al.* 2001). A produção e o acúmulo dessas substâncias estão relacionados com estresses abióticos como deficiência hídrica, temperatura supra ou infra-ótima, excesso de radiação, deficiência nutricional e/ou bióticos como pragas e doenças (Rice 1984; Einhellig 1995; Einhellig 1986; Inderjit 1996).

A ação de vários aleloquímicos se faz pela inibição e modificações nos padrões de crescimento e/ou desenvolvimento das plantas (Gatti *et al.* 2004). O crescimento por divisão celular é inibido por cumarinas, derivados fenólicos e alguns monoterpenos e sesquiterpenos (Inderjit *et al.* 1995; Galindo *et al.* 1999; Chon *et al.* 2002). As atividades da celulase, proteinases, desidrogenases e descarboxilases são afetadas por taninos e fenóis (Jain & Srivastava 1981; Inderjit *et al.* 1995; Yu *et al.*

2003). A inibição dessas enzimas deve-se à capacidade de taninos e fenóis se ligarem às proteínas, formando complexos reversíveis ou irreversíveis que ocorrem em condições oxidativas (Mello & Santos 2001).

A fotossíntese e a atividade respiratória são inibidas por quinonas, ácidos vanílico, ferúlico cumárico e caféico (Rizvi & Rizvi 1992; Hejl *et al.* 1993; Jose & Gillespie 1998; Barkosky *et al.* 2000; González-Bernardo *et al.* 2003) e, também por ancecalina, euparina e dimetilencecalina, substâncias extraídas de raízes de *Helianthella quinquenervis* (Castañeda *et al.* 1996). Da parte aérea de *Piqueria trinervia* foram extraídos monoterpênicos, que se mostraram inibidores do fluxo de elétrons da fotossíntese (Anaya *et al.* 1996). Compostos como benzopirano, lactonas, terpenos e fenilpropanóides, isolados de espécies vegetais, atuam como inibidores da reação de Hill, assim como algumas cumarinas e lactonas sesquiterpênicas que agem como desacopladores e inibidores da transferência de elétrons (King-Diaz *et al.* 2001). Ácido salicílico, em elevadas concentrações, afetou severamente o crescimento, a transpiração e o potencial hídrico em *Glycine max* e *Zea mays* (Barkosky & Einhellig 1993). O derivado fenólico juglona reduziu a taxa fotossintética, a respiração e a transpiração em plantas de milho e soja (Jose & Gillespie 1998).

A permeabilidade da membrana celular e a atividade da ATPase em soja podem ser alteradas pelos ácidos benzóico e cinâmico e por flavonóides, com interferência na absorção de íons. As substâncias aleloquímicas podem alterar a permeabilidade da membrana pela ruptura de sua estrutura ou pela redução da atividade das proteínas intermembranas (Baziramakenga *et al.* 1995; Inderjit *et al.* 1995; Friebe *et al.* 1997; Galindo *et al.* 1999). Algumas perturbações nas membranas das células causadas por quinonas, hidroquinona e ácidos salicílico e caféico podem alterar o balanço hídrico e, conseqüentemente, inibir o crescimento da planta (Barkosky & Einhellig 1993; Barkosky *et al.* 1999; Barkosky *et al.* 2000).

Princípios ativos com potencial alelopático, têm sido encontrados em algumas espécies nativas do Cerrado brasileiro, como *Caryocar brasiliense*, *Andira humilis*, *Solanum lycocarpum* e *Aristolochia esperanzae* (Periotto *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004; Gatti *et al.* 2004, Moreira, 2005).

*Caryocar brasiliense*, popularmente conhecido como pequi, apresenta grande diversidade química. Do extrato metanólico das folhas de *C. brasiliense* foram isoladas algumas substâncias de aplicação medicinal, como friedelina, friedenalol,

ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol,  $\beta$ -amirina e ácido elágico. A caracterização físico-química dos frutos dessa espécie demonstrou elevados teores de proteínas, lipídeos, glicídios e minerais (Oliveira 1968, Oliveira 1970). A casca e as folhas de *C. brasiliense* contêm elevado teor de tanino, constituindo de matéria-prima para a fabricação de tinturas (Marques *et al.* 2002). O uso alimentar do fruto é muito difundido, sendo o mesmo considerado uma fonte rica em manganês e fósforo (Almeida & Silva 1994). Apesar de *C. brasiliense* apresentar grande importância, tanto medicinal quanto comercial, pouco se sabe sobre o seu potencial alelopático, sendo necessários estudos para comprovar essa possibilidade.

## 2- OBJETIVOS

- Determinar a ação alelopática dos extratos metanólicos de folha, caule e raiz de *Caryocar brasiliense* na germinação e no crescimento inicial de *Bidens pilosa*.
- Selecionar o extrato ativo com maior atividade inibitória .
- Avaliar os efeitos do extrato ativo selecionado de *Caryocar brasiliense* na germinação, crescimento inicial, trocas gasosas, teores de pigmentos e fluorescência da clorofila “a” em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.
- Avaliar os efeitos das frações provenientes do extrato ativo de *Caryocar brasiliense* na germinação e crescimento inicial em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.
- Selecionar a fração ativa com maior atividade inibitória.
- Avaliar os efeitos da fração ativa sobre enzimas antioxidativas, peroxidação lipídica e permeabilidade de membrana em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.
- Identificar as substâncias químicas e os grupos funcionais presentes na fração ativa de *Caryocar brasiliense* mediante cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa e espectrometria no infravermelho.

### **3- MATERIAL VEGETAL E METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO**

#### ***Preparo dos extratos brutos***

Folhas, caules e raízes de plantas adultas de *Caryocar brasiliense*, provenientes do Cerrado da região de Uberlândia, MG, foram coletadas e, em seguida, secas à 45°C, até atingirem peso constante. O material seco foi triturado e peneirado (malha de 0,5 mm, aproximadamente) até obtenção de um pó homogêneo.

Para obtenção do extrato bruto metanólico da folha (EMF), extrato bruto metanólico do caule (EMC) e o extrato bruto metanólico da raiz (EMR), utilizou-se aproximadamente 300 g de amostra por litro de metanol. Após sete dias, com agitações periódicas e, após filtração em funil poroso com papel-filtro, obteve-se uma solução contendo o extrato removido. Os filtrados obtidos foram concentrados, com auxílio de um evaporador rotativo à temperatura de 40°C até secarem totalmente, obtendo-se as massas brutas dos extratos concentrados, as quais foram mantidas em dessecador.

Na preparação das soluções estoque, cinco gramas da massa bruta dos extratos foram dissolvidos em 5 mL de metanol + 5 mL de Twen20/DMSO (1/1;v:v) e, em seguida, completado o volume para um litro. A partir dessa solução foram realizadas diluições para a obtenção das concentrações utilizadas nos experimentos.

#### ***Fracionamento do extrato bruto***

O EMF foi fracionado através de cromatografia de adsorção em coluna preenchida com cerca de 75% de sílica branca para cromatografia e, 25% de sílica incorporada ao extrato bruto. A coluna cromatográfica foi constituída por um tubo de vidro em posição vertical de 110 mm de diâmetro interno e um metro de comprimento.

Em seguida, a seguinte seqüência de solventes foi aplicada à coluna: diclorometano (DCM), acetato de etila (ACT), acetato de etila/metanol 1:1 (v:v) (ACT/ML 1:1), acetato de etila/metanol 7:3 (v:v) ACT/ML 7:3 e metanol (ML), segundo Inderjit & Dakshini (1995) e Inderjit & Weston (2000). A quantidade de cada solvente aplicado foi determinada pela capacidade de arraste de cada solvente. As frações eluídas foram concentradas no evaporador rotativo à 40°C até secarem totalmente, obtendo-se a massa das frações concentradas.

Na preparação das soluções estoque, cinco gramas da massa das frações foram dissolvidas em 5 mL de metanol + 5 mL de Twen20/DMSO (1/1;v:v) e, em seguida, completado o volume a um litro. A partir dessa solução foram realizadas diluições para a obtenção das concentrações utilizadas nos experimentos.

## CAPÍTULO 1

### ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATO METANÓLICO BRUTO E FRACIONADO DE *Caryocar brasiliense* NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*

#### 1.1-INTRODUÇÃO

Diversos princípios ativos, produtos do metabolismo secundário das plantas, possuem capacidade de inibir processos como a germinação e crescimento das plantas nos seus primeiros estádios de desenvolvimento (Inderjit *et al.* 1995). Essa capacidade inibitória inclui o atraso ou a inibição completa da germinação de sementes, redução do crescimento, injúria no sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas (Rice 1984).

Existem muitos trabalhos que relatam os efeitos de aleloquímicos na germinação e crescimento obtidos mediante bioensaios, porém, os mecanismos que dificultam esses processos são ainda desconhecidos (Periotto *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004; Gatti *et al.* 2004). Provavelmente, as alterações no padrão da germinação podem ser resultantes de alterações no tegumento das sementes, que poderiam impedir a troca gasosa e ou o fluxo de água para a embebição. Outra possibilidade é a alteração da permeabilidade de membranas, respiração por seqüestro de oxigênio, mudança na conformação de enzimas e de receptores, ou ainda, pela combinação destes fatores (Ferreira & Aquila 2000). Algumas lactonas sesquiterpênicas foram capazes de inibir a germinação afetando macromoléculas como proteínas hidrossolúveis, carboidratos e atividades de enzimas específicas como protease,  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases (Singh 2002).

Na fase de implantação, os efeitos de aleloquímicos são maiores que durante a germinação e, a altura das plântulas e a produção de matéria seca total têm sido consideradas variáveis mais importantes quando se pretende avaliar efeitos alelopáticos de extratos vegetais (Ferreira & Áquila 2000).

As espécies nativas do Cerrado brasileiro têm despertado interesses em pesquisas fitoquímicas, em razão da grande diversidade de substâncias químicas que possuem. Porém, poucos são os estudos relacionando essas espécies com atividade alelopática na germinação e no desenvolvimento de plântulas. Pesquisas sobre os mecanismos de ação, produção e decomposição de compostos alelopáticos, assim

como o ciclo desses compostos nas plantas tornam-se necessárias (Periotto *et al.* 2004).

Os objetivos desse trabalho foram, portanto, investigar os efeitos alelopáticos dos extratos brutos metanólicos de *Caryocar brasiliense* e das suas frações, na germinação e no crescimento inicial de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*, além de identificar o extrato e a fração com maior efeito inibitório nas variáveis analisadas.

## 1.2- MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento I

#### **Seleção do extrato ativo de *Caryocar brasiliense* mediante a avaliação da germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa*.**

Testes de germinação e crescimento inicial foram realizados em sementes e plântulas de *Bidens pilosa* L. com os extratos brutos metanólicos da folha (EMF), caule (EMC) e raiz (EMR) de *Caryocar brasiliense* Camb. a fim de selecionar o extrato com maior atividade inibitória (extrato ativo).

Sementes de *B. pilosa* foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, formato e coloração, previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 2%, e secas em papel de filtro. Os testes de germinação foram realizados em placas de Petri autoclavadas e revestidas com papel de filtro. Em cada placa de Petri, de 90 mm de diâmetro, foram distribuídas 25 sementes de *B. pilosa* e, adicionados oito mL dos extratos de *C. brasiliense* nas concentrações 0, 1000, 2500 e 5000 ppm, com quatro repetições por tratamento. As placas permaneceram em câmara de germinação do tipo BOD Modelo 3740 (Forma Scientific, Inc. BOX 649 MARIETTA, OHIO 45750) com uma irradiância de 350  $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoper\u00edodo de 8/16h de luz e temperatura constante de 25<sup>0</sup>C.

O controle da germinação foi avaliado a cada 24 horas, considerando como crit\u00e9rio de germinação a emissão de 2 mm da rad\u00edcula. A inibi\u00e7\u00e3o da germinação foi calculada de acordo com Labouriau & Valadares (1976) e o \u00edndice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado registrando-se diariamente o n\u00famero de sementes germinadas (Maguire 1962). Essas vari\u00e1veis foram monitoradas por um per\u00edodo de sete dias.

Para avaliar o crescimento inicial, foram utilizadas sementes de *B. pilosa* germinadas nas mesmas condições do experimento anterior. Após 10 dias, foram determinadas a altura das plântulas e a matéria seca total.

Para verificar a possível interferência do metanol, Twen20 e DMSO, usados para a obtenção dos extratos, testes germinativos e de crescimento inicial foram realizados em *Bidens pilosa* L., *Glycine max* (linhagem L150) e *Zea mays* (cultivar UFVM100 *Nativo*).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3, sendo controle mais três níveis de concentração de extratos e três tipos de extratos metanólicos de *C. brasiliense* com quatro repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), regressão e testes de significância de 1 e 5% de probabilidade. Os dados experimentais de germinação foram ajustados através do seguinte modelo matemático:  $Y = x/a + bx$ .

## **Experimento II**

### **Avaliação dos efeitos do EMF sobre a germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays***

A metodologia utilizada para a germinação e crescimento inicial de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* seguiu as mesmas condições do experimento anterior. Em cada placa de Petri foram distribuídas 25 sementes, de cada espécie e, adicionados oito mL, para *B. pilosa* e, 10 mL, para *G. max* e *Z. mays* da solução do EMF de *C. brasiliense* nas concentrações 0, 1000, 2500 e 5000 ppm. As placas permaneceram em estufa de germinação com uma irradiância de 350  $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com fotoper\u00edodo de 8/16h de luz e temperatura constante de 25<sup>0</sup>C para *B. pilosa* e *G. max* e, 28<sup>0</sup>C para *Z. mays*.

O controle da germinação foi avaliado a cada 24 horas, considerando como crit\u00e9rio de germinação a emissão de uma rad\u00edcula de 2 mm. Para a germinação foram calculadas a porcentagem de germinação (Labouriau & Valadares 1976) e o \u00edndice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire 1962).

Para avaliar o crescimento inicial, foram utilizadas sementes de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* germinadas nas mesmas condições do experimento anterior. Após 10 dias, foram determinadas a altura das plântulas e a matéria seca total.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3, sendo controle mais três níveis de concentração de EMF e três esp\u00e9cies vegetais

com quatro repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), regressão e testes de significância de 1 e 5% de probabilidade. Os dados experimentais de germinação foram ajustados através do seguinte modelo matemático:  $Y = x/a + bx$ .

### **Experimento III**

#### **Seleção da fração mais ativa do EMF mediante a avaliação dos efeitos na germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.**

A metodologia utilizada para a germinação e crescimento inicial de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* seguiram as mesmas condições do experimento anterior, diferindo, apenas, nos tratamentos e concentrações.

As sementes de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* foram submetidas aos tratamentos com as frações diclorometano (DCM), acetato de etila (ACT), acetato de etila/metanol 1:1 (ACT/ML 1:1), acetato de etila/metanol 7:3 (ACT/ML 7:3) e metanol (ML), nas concentrações 0 e 5000 ppm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5x3, sendo controle mais um nível de concentração de cada fração, cinco frações do EMF, três espécies vegetais com quatro repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), regressão e testes de significância de 1 e 5% de probabilidade. Os dados experimentais de germinação foram ajustados através do seguinte modelo matemático:  $Y = x/a + bx$ .

## **1.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Experimento I**

#### **Efeitos na germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa* submetidas aos extratos de *Caryocar brasiliense* e seleção do extrato ativo.**

Para avaliar as eventuais interferências de alguns solventes adicionados às soluções dos extratos, foram realizados experimentos cujos resultados são mostrados na tabela 1.1. Não houve diferença significativa nos testes de germinação e crescimento inicial realizados com água e uma solução de água, metanol e twen20/DMSO, demonstrando que essas substâncias não foram capazes de interferir na germinação e crescimento de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Dessa forma, optou-se pelo controle com água, metanol e twen20/DMSO, descrito pela concentração 0.

Através dos resultados obtidos para a germinação das sementes de *B. pilosa*, na presença de EMF, EMC e EMR, percebeu-se que o EMF foi o que mais causou inibição na germinação (Fig.1.1).

A concentração do EMF para se obter 50% de inibição da germinação ( $L_{50}$ ) em *B. pilosa* foi um pouco menor que a metade da concentração utilizada no experimento, indicando que as mesmas seriam adequadas para causar alterações no metabolismo dessa espécie.

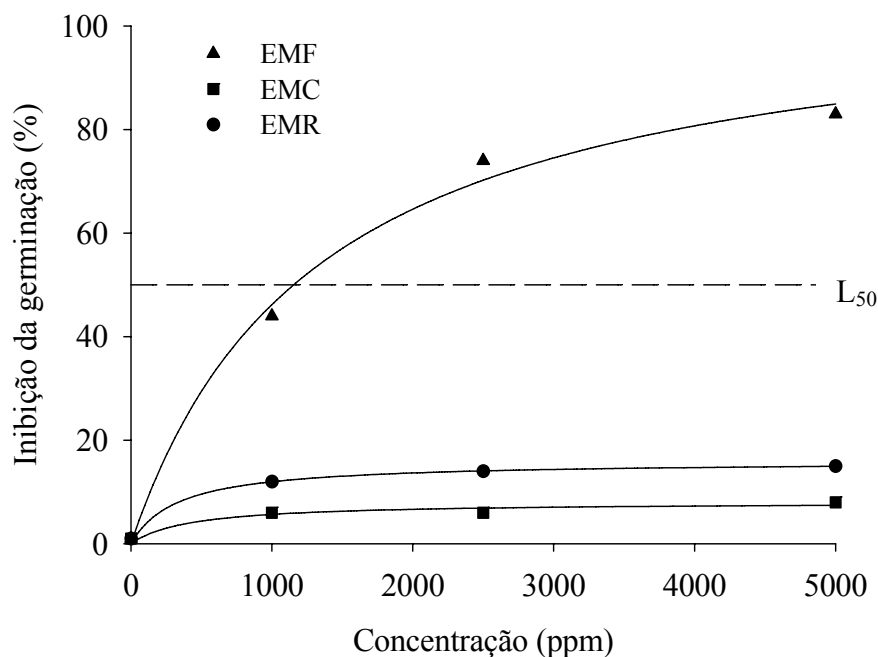
Nos tratamentos com EMC e EMR, pôde-se observar que os  $L_{50}$  seriam elevados, indicando que os tratamentos aplicados nesse experimento nas concentrações utilizadas seriam, portanto, menos eficazes na inibição da germinação em *B. pilosa*, quando comparados com EMF (Fig.1.1).

No entanto, todos os outros extratos de *C. brasiliense* diminuíram significativamente a velocidade de germinação das sementes nas concentrações utilizadas, quando comparadas com o controle (Fig.1.2).

**Tabela 1.1** : Efeito dos tratamentos-controle na inibição da germinação (IG%), índice de velocidade de germinação (IVG), altura e matéria seca total (MST) em *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*

Espécie	Tratamento controle	Variáveis			
		IG (%)	IVG	Altura (mm)	MST(g)
<i>B. pilosa</i>	Água	01A	5,29 A	12,2 A	0,045 A
	Água, metanol e Twen20/DMSO	02A	5,36 A	11,9 A	0,043 A
<i>G. max</i>	Água	01A	4,18 A	13,3 A	0,156 A
	Água, metanol e Twen20/DMSO	01A	4,15 A	12,9 A	0,161 A
<i>Z. mays</i>	Água	04 A	4,01 A	21,8 A	0,358 A
	Água, metanol e Twen20/DMSO	03 A	3,96 A	21,9 A	0,361 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Extrato	Equação de regressão	R <sup>2</sup>
EMF	$Y = \frac{X}{12,3472^* + 0,0093^{**}.X}$	99,13 <sup>++</sup>
EMC	$Y = \frac{X}{51,9950^{ns} + 0,1243^*.X}$	87,47 <sup>+</sup>
EMR	$Y = \frac{X}{20,7805^{ns} + 0,0627^{**}.X}$	98,79 <sup>++</sup>

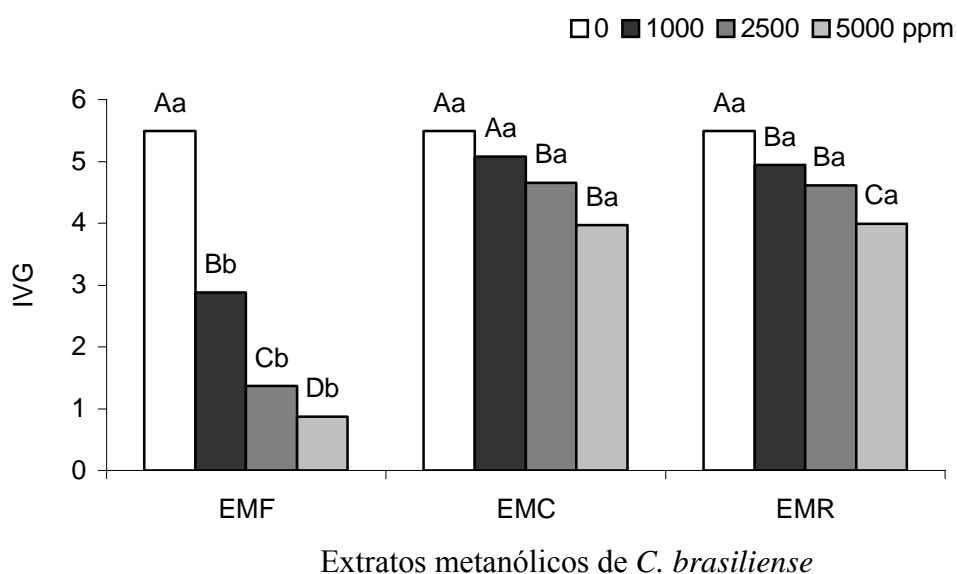
<sup>++</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.    <sup>+</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.    <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.  
<sup>ns</sup> Não significativo

**Figura 1.1.:** Efeito dos extratos metanólicos de *C. brasiliense* na inibição da germinação (%) de *B. pilosa*. Equação e R<sup>2</sup> referentes à taxa de germinação de *B. pilosa* submetidos aos extratos metanólicos de *C. brasiliense*. EMF: extrato metanólico da folha; EMC: extrato metanólico do caule; EMR: extrato metanólico da raiz.

Embora os resultados não permitam esclarecer os mecanismos inibitórios da germinação, alguns deles estão bem fundamentados na literatura, como a redução das trocas gasosas ou a alteração da permeabilidade do tegumento à difusão da água na fase I da germinação. Piña-Rodrigues & Lopes (2001) também observaram que os extratos de *Mimosa caesalpiniaefolia* não afetaram a percentagem de germinação, porém, os mesmos extratos reduziram a velocidade de germinação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia alba*). Em alface tratada com extratos de caule, raiz e folha de *Aristolochia esperanzae*, foi comprovada uma maior inibição da germinação com o

extrato foliar (Gatti *et al.* 2000). Os extratos brutos metanólicos das folhas, dos botões florais e dos frutos de *C. brasiliense*, inibiram a germinação do fungo *Fusarium oxysporum*, demonstrando a sua ação alelopática (Marques *et al.* 2002).

Substâncias químicas com atividade alelopática estão presentes em todos os órgãos das plantas, como folhas, rizomas, sementes e raízes, entretanto, a distribuição das substâncias não é uniforme, havendo variações em função da espécie e do órgão da planta analisado (Juan Jimenez-Osornio *et al.* 1996, Delachiave *et al.* 1999, Wu *et al.* 2000, Souza Filho 2002, Periotto *et al.* 2004).



**Figura 1.2:** Efeito dos extratos metanólicos de *C. brasiliense* na velocidade de germinação (IVG) de *B. pilosa*. EMF: extrato metanólico da folha; EMC: extrato metanólico do caule; EMR: extrato metanólico da raiz. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre as concentrações e minúsculas entre os tratamentos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os extratos utilizados nos experimentos eram de natureza metanólica, o que deixa margem a especulações sobre sua aplicabilidade em situações naturais de campo. Muitas técnicas para o estudo da alelopatia incluem e/ou padronizam a utilização de extratos aquosos em testes de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas realizados em laboratórios, por possuírem um veículo natural que está sempre presente no ambiente, a água. Os extratos aquosos são considerados mais naturais por refletirem a situação normal de lançamento dos aleloquímicos ao ambiente, como através de lixiviações (Ferreira 1998). Porém, quando se pretende

identificar e isolar um composto químico vegetal com potencial herbicida, os extratos alcoólicos, como etílico e metanólico, se tornam mais eficientes, por extraírem mais substâncias químicas dos tecidos das plantas (Inderjit & Dakshini 1995).

O crescimento das plântulas de *B. pilosa* foi menor em todas as concentrações do EMF, refletido pelo menor valor da altura. Em EMR e EMC reduções significativas no crescimento das plântulas foram observadas a partir da concentração de 2500 ppm e de 5000 ppm, respectivamente (Tab.1.2). O peso da matéria seca total das plântulas foi menor a partir da concentração de 2500 ppm de EMF e, apenas na concentração de 5000 ppm nos EMC e EMR (Tab.1.2). Características semelhantes de inibição de crescimento foram observadas em plântulas de alface e rabanete, as quais sofreram redução significativa do comprimento quando tratadas com extratos de caule e folha de *Andira humilis* (Periotto *et al.* 2004).

**Tabela 1.2:** Efeito dos extratos metanólicos da folha (EMF), caule (EMC) e raiz (EMR) de *C. brasiliense* na altura das plântulas e na matéria seca total de *B. pilosa*.

Variável	Extrato	Concentração (ppm)			
		0	1000	2500	5000
Altura (mm)	EMF	118,5 Aa	94,8 Bb	70,5 Bb	29,9 Cc
	EMC	118,5 Aa	108,7 Aa	105,4 Aa	97,8 Ba
	EMR	118,5 Aa	107 Aa	98,9 Ba	89,6 Bb
Matéria seca total (g)	EMF	0,044 Aa	0,032 Ab	0,021 Bb	0,011 Cb
	EMC	0,044 Aa	0,041 Aa	0,039 Aa	0,034 Ba
	EMR	0,044 Aa	0,039 Aa	0,037 Aa	0,033 Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos de germinação e crescimento inicial realizados em *B. pilosa*, foi selecionado o EMF de *C. brasiliense*. Esse extrato provocou maior inibição na germinação e no crescimento inicial de *B. pilosa* e, portanto, foi considerado o mais ativo, comparativamente aos demais extratos.

## Experimento II

### Efeitos do EMF na germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.

A germinação em *B. pilosa* foi a mais severamente afetada pelo EMF. Na concentração de 1000 ppm de EMF obteve-se uma inibição na germinação de 44% em *B. pilosa*, enquanto nas maiores concentrações, de 2500 e 5000 ppm de EMF, a inibição atingiu valores de 74 e 83%, respectivamente (Fig.1.3). A inibição da germinação em *G. max* foi menor, atingindo 12% na concentração de 1000 ppm e 16% nas concentrações 2500 e 5000 ppm, respectivamente (Fig.1.3). As concentrações de 1000, 2500 e 5000 ppm de EMF em *Z. mays* resultaram em 26, 54 e 78% de inibição da germinação, respectivamente, demonstrando que a inibição se encontra diretamente relacionada com a concentração do extrato (Fig. 1.3).

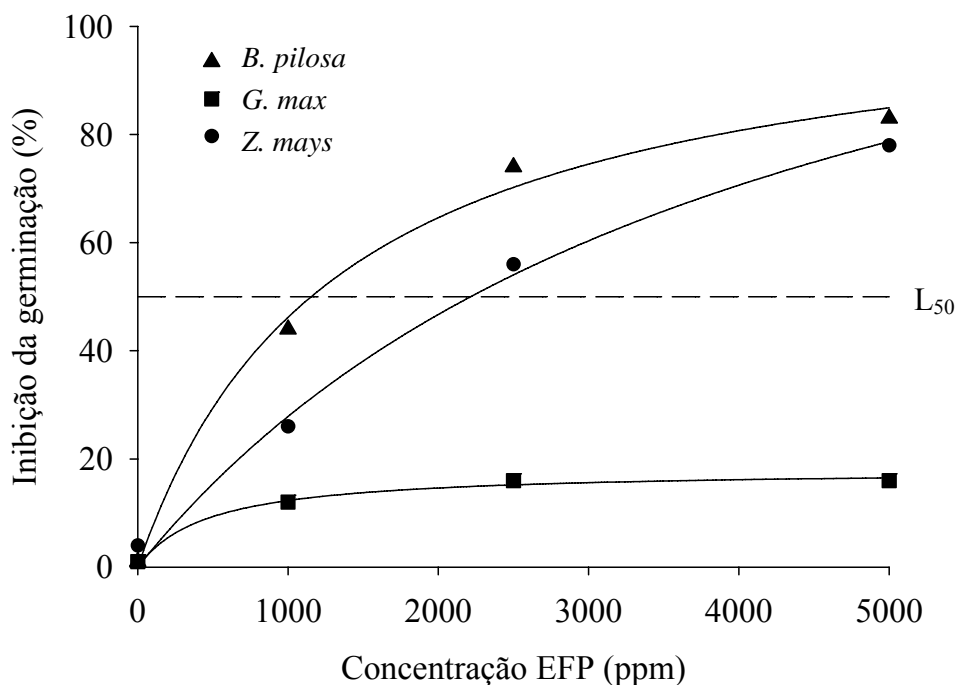
As concentrações de EMF para atingir o  $L_{50}$  em *B. pilosa* e *Z. mays*, estavam dentro da faixa de concentração aplicadas nos testes de germinação. Em *G. max* não foi possível a observação dessa variável (Fig 1.3).

O  $L_{50}$  fornece informações sobre a tolerância das espécies em relação às concentrações das substâncias químicas nelas aplicadas e, na prática, torna-se possível descobrir e/ou desenvolver substâncias químicas com seletividade e especificidade para cada grupo vegetal (Waller *et al.* 1999).

Pelos valores do  $L_{50}$  pôde-se verificar uma maior sensibilidade de *B. pilosa* e *Z. mays* aos aleloquímicos presentes no EMF, em relação à *G. max*. Resultados com aleloquímicos como alcalóides, cianidrinás, quinonas e ácidos benzóicos e cinâmico mostraram uma progressão dos efeitos inibitórios em diferentes espécies na medida em que se aumentava a sua concentração (Vyvyan 2002).

A velocidade de germinação (IVG) em *B. pilosa* foi reduzida significativamente à medida que se aumentava a concentração do EMF (Fig. 1.4). O IVG foi menor na concentração de 5000 ppm, estando diretamente relacionado com a elevada inibição da germinação (83%) obtida nessa concentração. O EMF interferiu na velocidade de germinação de *Z. mays* apresentando uma redução significativa entre as concentrações, estando diretamente relacionado com a queda na germinação (Fig.1.4). Assim como na inibição da germinação, a menor velocidade de germinação foi obtida na concentração de 5000 ppm de EMF (Fig 1.4). Em *G. max*, a velocidade de germinação apresentou redução significativa, porém menos acentuada do que a observada para *B. pilosa* e *Z. mays* (Fig. 1.4). A velocidade da germinação em

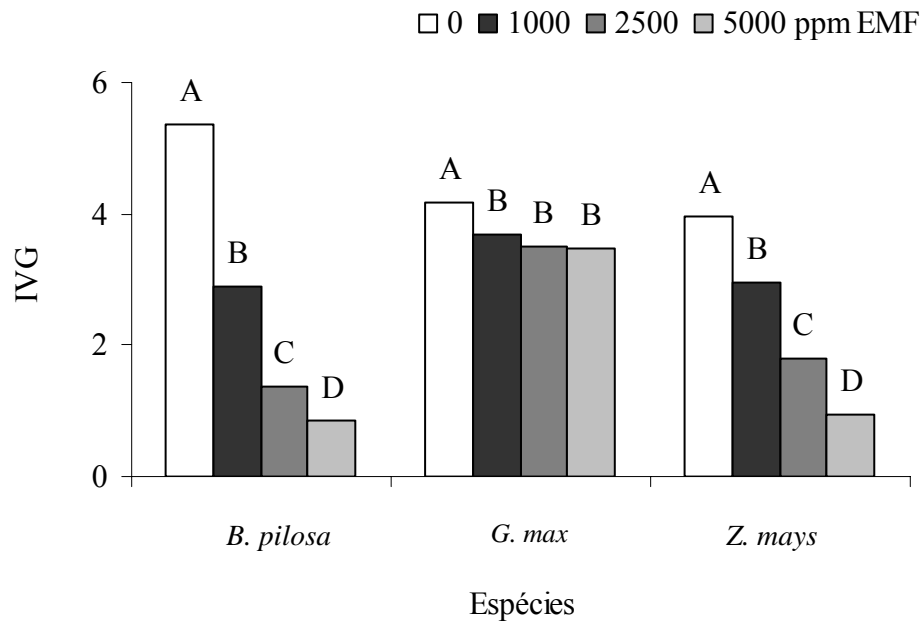
diferentes espécies e sob diferentes estresses se encontra relacionada com as taxas de embebição na fase I da germinação, o que poderia indicar alterações na permeabilidade dos tegumentos das sementes submetidas ao EMF.



Espécie	Equação de regressão	R <sup>2</sup>
<i>B. pilosa</i>	$Y = \frac{X}{12,3472^* + 0,0093^{**}.X}$	99,13 <sup>++</sup>
<i>G. max</i>	$Y = \frac{X}{25,8659^{ns} + 0,0554^{**}.X}$	98,03 <sup>++</sup>
<i>Z. mays</i>	$Y = \frac{X}{28,9996^* + 0,0069^*.X}$	98,88 <sup>++</sup>

<sup>++</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.    <sup>+</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.    <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.  
<sup>ns</sup> Não significativo

**Figura 1.3:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na inibição da germinação (%) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Equação, R<sup>2</sup> referentes à taxa de germinação de cada espécie submetidas ao EMF.



**Figura 1.4:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na velocidade de germinação (IVG) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A altura das plântulas de *B. pilosa* e de *Z. mays* sofreu influência do EMF, principalmente, na concentração de 5000 ppm, com reduções de 75 e 42%, respectivamente, em relação ao controle (Tab.1.3). A altura das plântulas de *G. max*, entretanto, não foi influenciada pelo tratamento (Tab.1.3).

Em *B. pilosa*, o peso da matéria seca total acompanha os resultados obtidos para altura, apresentando menor acúmulo de matéria seca entre as concentrações (Tab.1.3). Não houve diferença significativa da matéria seca total em *G. max*. Em *Z. mays* observou-se menor acúmulo de matéria seca total em todas as concentrações, sendo que na concentração de 5000 ppm, essa redução foi mais acentuada (Tab.1.3).

*B. pilosa* demonstrou ser a espécie mais sensível ao EMF, apresentando uma redução acentuada no crescimento inicial à medida que se aumentava a concentração do extrato. Resultado semelhante, observado também em *B. pilosa*, mostrou que quando tratada com partenina, uma lactona sesquiterpênica extraída de *Parthenium hysterophorus*, a germinação e o crescimento em concentrações elevadas foram severamente afetados (Batish *et al.* 2002). Outro aleloquímico, a mimosina, extraída de *Leucaena leucocephala*, também foi capaz de reduzir a germinação e o crescimento de *B. pilosa* em elevadas concentrações, além de induzir deformação no limbo foliar (Pires *et al.* 2001).

**Tabela 1.3:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na altura das plântulas e matéria seca total de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*

Variável	Concentração EMF (ppm)	<i>B.pilosa</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>
Altura (mm)	0	118,5 A	123,0 A	219,0 A
	1000	98,4 B	119,3 A	182,4 B
	2500	70,5 C	115,2 A	154,6 C
	5000	29,9 D	114,8 A	123,1 C
Matéria seca total (g)	0	0,044 A	0,161 A	0,361 A
	1000	0,032 B	0,152 A	0,229 B
	2500	0,021 C	0,149A	0,210 B
	5000	0,011 D	0,143 A	0,186 C

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Assim como para o EMF, o extrato aquoso de sorgo apresentou pouco efeito na germinação, na velocidade de germinação, no comprimento e na massa seca das plântulas de *G. max*. É possível que o sítio de ação do aleloquímico nessa espécie não esteja relacionado à inibição da divisão celular do eixo embrionário, resultando na elevada taxa de germinação (Correia *et al.* 2005). Possivelmente, a mesma situação pode estar ocorrendo com *G. max* neste experimento, que demonstrou ser tolerante aos aleloquímicos presentes o EMF.

A inibição do crescimento inicial observada em *Z. mays* ao EMF, reflete a sensibilidade dessa espécie aos aleloquímicos presentes nesse extrato. Em experimento semelhante, o tratamento de *Z. mays* com extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* (leucena), não resultou na inibição da germinação, mas interferiu no comprimento e na biomassa seca total de *Z. mays*, além de causar necrose apical, principalmente na raiz primária (Prates *et al.* 2000).

Outras espécies de Cerrado estão sendo testadas através de bioensaios de germinação e crescimento, a fim de verificar seus potenciais alelopáticos. Testes de germinação e crescimento de alface e rabanete realizados com extratos de caule e folhas de *Andira humilis*, conhecida como angelim-do-campo, mostraram que plântulas de alface foram mais sensíveis aos extratos do que plântulas de rabanete (Periotto *et al.* 2004). Extrato de folha de *Solanum lycocarpum*, conhecida como lobeira, diminuiu a velocidade e a taxa de germinação de gergelim e, posteriormente, interferiu no crescimento, resultando em alterações morfológicas nas plântulas, como

ausência de pêlos absorventes nas raízes (Oliveira *et al.* 2004). Extratos aquosos de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* foram testados na germinação e no crescimento de alface e rabanete e pôde-se concluir, que os extratos de folha foram os que mais afetaram a percentagem de germinação de alface e rabanete, e os de caule e raiz, causaram anormalidade nas plântulas (Gatti *et al.* 2004).

### **Experimento III**

#### **Efeitos das frações do EMF sobre a germinação e crescimento inicial de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays* e seleção da fração mais ativa**

*B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* apresentaram respostas distintas quando tratadas com as frações diclorometano (DCM), acetato (ACT), metanol (ML), acetato/metanol:1 (ACT/ML 1:1) e acetato/metanol 7:3 (ACT/ML 7:3).

O tratamento com a fração DCM resultou na maior redução na germinação de *B. pilosa*. Na concentração de 5000 ppm houve inibição da germinação em 92%. Por outro lado, a fração ACT/ML 7:3 foi a que apresentou menor efeito na germinação de *B. pilosa*, atingindo apenas 37% de inibição em 5000 ppm. Todas as frações tiveram efeito inibitório sobre a germinação e, estes efeitos foram crescentes com o aumento da concentração. As frações ACT, ML e ACT/ML 1:1 apresentaram respostas intermediárias sobre a germinação de *B. pilosa*, com 61, 46 e 40% de inibição em 5000 ppm, respectivamente (Fig. 1.5, Tab.1.4).

A germinação de *G. max* foi pouco influenciada pelos tratamentos. As frações DCM e ACT inibiram 15% da germinação na maior concentração, em ambos os tratamentos. A fração com menor efeito na germinação foi a ML com 12% de inibição em 5000 ppm, assim como as frações ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3, que apresentaram valores intermediários como 14 e 13% de inibição da germinação, respectivamente na mesma concentração (Fig. 1.5, Tab.1.5).

Houve aumento na inibição da germinação em *Z. mays* à medida que se aumentava a concentração dos tratamentos. A fração DCM apresentou o maior efeito sobre a germinação, atingindo uma redução de 73% na concentração de 5000 ppm. As frações ACT, ML, ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3 apresentaram a mesma tendência inibitória da germinação em *Z. mays*, apresentando reduções de 34, 46, 43 e 30% na maior concentração, respectivamente (Fig. 1.5, Tab.1.6). Peres *et al.* (1998) também observaram que as frações do extrato de *Gleichenia pectinata* provocaram nítido retardo na germinação de *Lactuca sativa*.

O  $L_{50}$  de *B. pilosa* para a fração DCM encontrou-se na faixa intermediária, entre 0 e 1000 ppm, considerado o menor valor observado dentre as frações. Em alguns casos não foi possível obter essa observação, uma vez que os tratamentos não inibiram 50% da germinação (Fig.1.5). Apenas as frações DCM e ACT apresentaram doses-resposta dentro da faixa das concentrações utilizadas nos tratamentos.

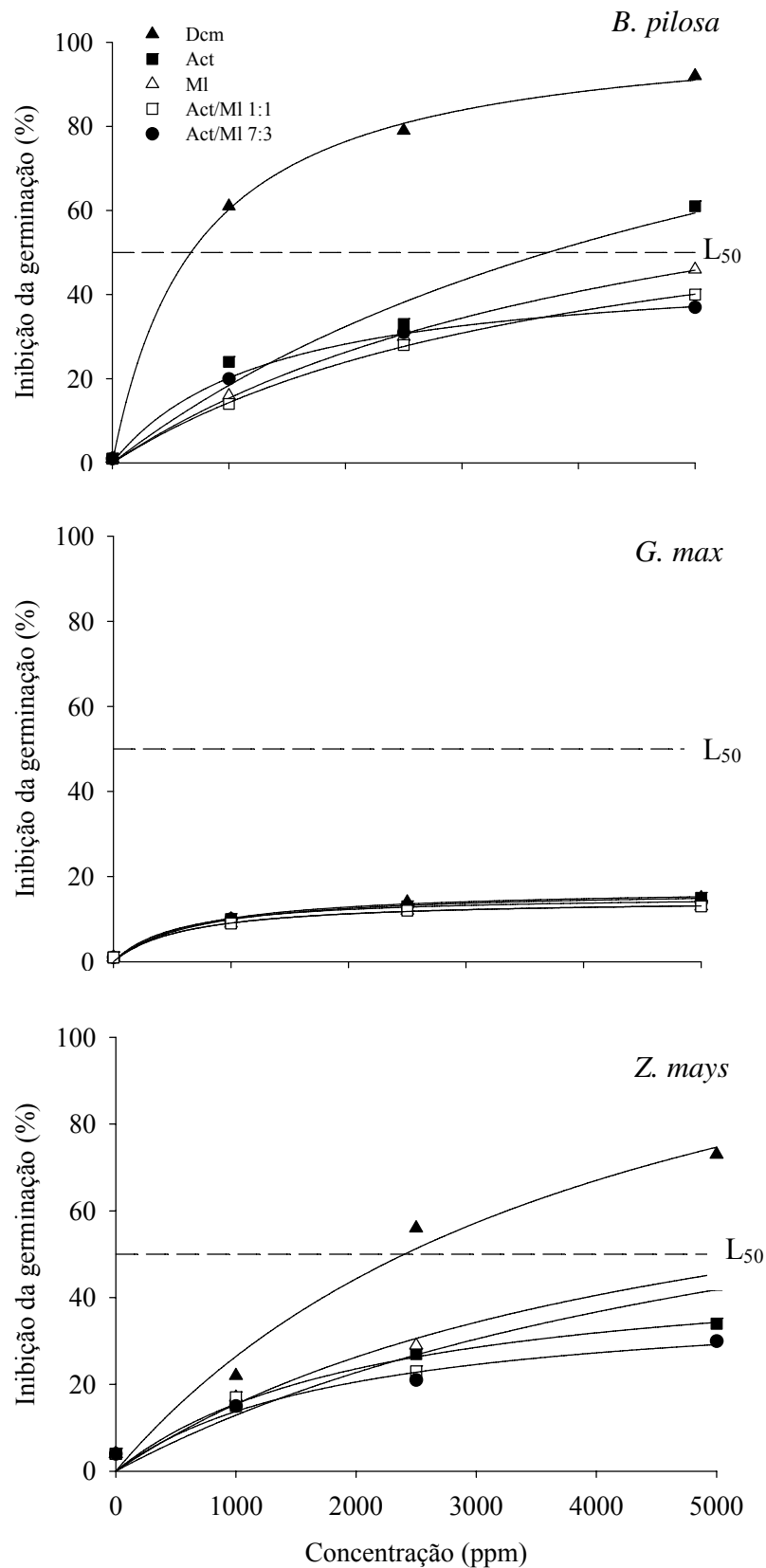
Em *G. max*, não foi possível observar a faixa na qual estariam os valores de  $L_{50}$ , pois os tratamentos não apresentaram inibição de 50% da germinação nessa espécie (Fig. 1.5). O  $L_{50}$  em *Z. mays*, para a fração DCM, encontrou-se dentro da faixa das concentrações utilizadas no experimento. Valores de  $L_{50}$  não foram observados nas frações ACT, ML, ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3 (Fig.1.5).

Comparativamente às outras frações, o  $L_{50}$  observado para *B. pilosa* com a fração DCM foi menor e, considerado semelhante ao observado no EMF. Em *Z. mays*, no mesmo tratamento, observou-se um  $L_{50}$  na faixa de 2000 e 3000 ppm. Mesmo sendo maior que o de *B. pilosa*, o  $L_{50}$  de *Z. mays* encontrou-se na faixa das concentrações utilizadas nos experimento (Fig. 1.5).

Em *B. pilosa*, a velocidade de germinação (IVG) decresceu significativamente com o aumento das concentrações das frações aplicadas. Nas frações DCM e ACT essa diferença foi evidenciada a partir de 1000 ppm, enquanto que para as outras frações, somente foram observadas a partir de 2500 ppm. Na concentração de 5000 ppm, a fração DCM foi a que mais reduziu o valor do IVG (Tab.1.7).

O IVG em *G. max* não foi influenciado por nenhum tratamento e, por nenhuma das concentrações aplicadas (Tab.1.7). Em *Z. mays*, os IVGs sofreram reduções apenas nos tratamentos com as frações DCM e ML nas concentrações de 2500 e 5000 ppm (Tab.1.7).

Em plântulas de *B. pilosa* o crescimento foi reduzido, demonstrando menor altura à medida que se aumentavam as concentrações da fração DCM (Tab.1.8). Os tratamentos com as frações ACT e ML resultaram em menor crescimento das plântulas apenas na concentração de 5000 ppm. As frações ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3 não tiveram influência significativa sobre a altura da planta nessa espécie. O tratamento com a fração DCM foi o que apresentou maior influência no crescimento de *B. pilosa* (Tab.1.8).



**Figura 1.5:** Efeito das frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na inibição da germinação (%) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. DCM: fração de diclorometano; ACT: fração de acetato de etila; ML: fração de metanol; ACT/ML 1:1: fração de acetato de etila/metanol 1:1; ACT/ML 7:3: fração de acetato de etila/metanol 7:3

**Tabela 1.4:** Equação e R<sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de *B. pilosa* submetida às frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF).

<b>Solvente extrator (fração)</b>	<b>Equação de regressão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DCM	$Y = \frac{X}{7,0144^{**} + 0,0096^{**} \cdot X}$	99,83 <sup>++</sup>
ACT	$Y = \frac{X}{46,7989^{ns} + 0,0075^{ns} \cdot X}$	95,01 <sup>++</sup>
ML	$Y = \frac{X}{54,0228^{**} + 0,0110^{**} \cdot X}$	99,75 <sup>++</sup>
ACT/ML 1:1	$Y = \frac{X}{56,1486^{**} + 0,0137^{**} \cdot X}$	99,78 <sup>++</sup>
ACT/ML 7:3	$Y = \frac{X}{28,3136^{**} + 0,0213^{**} \cdot X}$	99,77 <sup>++</sup>

<sup>++</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.    <sup>+</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.    <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Tabela 1.5:** Equação e R<sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de *G. max* submetida às frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF).

<b>Solvente extrator (fração)</b>	<b>Equação de regressão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DCM	$Y = \frac{X}{40,7214^{ns} + 0,0574^{*} \cdot X}$	98,42 <sup>++</sup>
ACT	$Y = \frac{X}{42,1600^{*} + 0,0588^{**} \cdot X}$	98,60 <sup>++</sup>
ML	$Y = \frac{X}{42,3458^{ns} + 0,0678^{*} \cdot X}$	98,21 <sup>++</sup>
ACT/ML 1:1	$Y = \frac{X}{35,5187^{ns} + 0,0638^{**} \cdot X}$	98,50 <sup>++</sup>
ACT/ML 7:3	$Y = \frac{X}{42,3458^{ns} + 0,0678^{**} \cdot X}$	98,21 <sup>++</sup>

<sup>++</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.    <sup>+</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.    <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Tabela 1.6:** Equação e R<sup>2</sup> referentes à inibição de germinação de *Z. mays* submetida às frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF).

<b>Solvente extrator (fração)</b>	<b>Equação de regressão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DCM	$Y = \frac{X}{30,5438^* + 0,0073^{ns}.X}$	96,92 <sup>++</sup>
ACT	$Y = \frac{X}{44,2381^{ns} + 0,0203^*.X}$	95,21 <sup>++</sup>
ML	$Y = \frac{X}{53,4789^* + 0,0113^{ns}.X}$	96,67 <sup>++</sup>
ACT/ML 1:1	$Y = \frac{X}{67,0758^{ns} + 0,0105^{ns}.X}$	90,77 <sup>+</sup>
ACT/ML 7:3	$Y = \frac{X}{47,9576^{ns} + 0,0247^*.X}$	91,00 <sup>+</sup>

<sup>++</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>+</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

<sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

<sup>ns</sup> Não significativo

A altura das plântulas de *G. max* não foi influenciada pelos tratamentos em nenhuma das concentrações testadas (Tab.1.8). *Z. mays*, de modo geral, sofreu maior efeito no crescimento do que *B. pilosa*. O aumento nas concentrações das frações DCM, ACT e ML, resultou na redução da altura das plântulas de *Z. mays* a partir de 1000 ppm. A aplicação das frações ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3 apresentou redução significativa apenas na concentração 5000 ppm (Tab.1.8).

A produção de matéria seca total em *B. pilosa* foi menor com aplicações das frações DCM, ACT E ML a partir de 1000 ppm (Tab.1.9). O tratamento com a fração DCM resultou na menor produção de matéria seca quando aplicado na concentração de 5000 ppm. Assim como aconteceu com a altura das plântulas, o tratamento com as frações ACT/ML 1:1 e ACT/ML 7:3 não resultou em diferenças significativas na produção de matéria seca (Tab.1.9).

Comparativamente, parece que a matéria seca total em *B. pilosa* foi mais influenciada pelos tratamentos do que a altura das plântulas, uma vez que, diferenças significativas na altura, somente foram observadas em 5000 ppm nas frações ACT e ML e na matéria seca a partir de 1000 ppm.

**Tabela 1.7 :** Efeito das frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na velocidade de germinação (IVG) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*

Espécie	Solvente extrator (fração)	Concentração (ppm)			
		0	1000	2500	5000
<i>B. pilosa</i>	DCM	5,36 Aa	2,18 Bc	1,17 Cb	0,61 Dc
	ACT	5,36 Aa	3,97 Bb	3,14 Ba	2,72 Bb
	ML	5,36 Aa	4,32 Aa	3,34 Ba	3,52 Ba
	ACT/ML 1:1	5,36 Aa	4,40 Aa	3,44 Ba	3,42 Ba
	ACT/ML 7:3	5,36 Aa	4,08 Aa	3,31 Ba	3,37 Ba
	<i>G. max</i>	DCM	4,15 Aa	3,76 Aa	3,59 Aa
ACT		4,15 Aa	3,78 Aa	3,64 Aa	3,54 Aa
ML		4,15 Aa	3,83 Aa	3,70 Aa	3,63 Aa
ACT/ML 1:1		4,15 Aa	3,81 Aa	3,66 Aa	3,59 Aa
ACT/ML 7:3		4,15 Aa	3,83 Aa	3,69 Aa	3,63 Aa
<i>Z. mays</i>		DCM	3,96 Aa	3,23 Aa	1,89 Bb
	ACT	3,96 Aa	3,52 Aa	2,91 Aa	2,54 Aa
	ML	3,96 Aa	3,46 Aa	2,81 Ba	2,15 Ba
	ACT/ML 1:1	3,96 Aa	3,47 Aa	3,08 Aa	2,39 Ba
	ACT/ML 7:3	3,96 Aa	3,55 Aa	3,18 Aa	2,81 Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Assim como o observado para a altura, os tratamentos não resultaram em alterações significativas na produção de matéria seca total nas plantas de *G. max* (Tab.1.9).

A produção de matéria seca total em *Z. mays* foi afetada pela aplicação das frações DCM, ACT e ACT/ML 7:3 a partir de 1000 ppm, sendo o maior efeito observado no tratamento com a fração DCM em 5000 ppm. A fração ACT/ML 1:1 não afetou a produção de matéria seca e, a fração ML, apenas em 5000 ppm (Tab. 1.9).

Dentre os tratamentos, a fração DCM foi a que inibiu com maior intensidade a germinação, a velocidade de germinação (IVG), a altura e a produção da matéria seca total em *B. pilosa* e *Z. mays*. As intensidades dos efeitos das diferentes frações variaram com as espécies estudadas.

**Tabela 1.8:** Efeito das frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) sobre a altura das plântulas (mm) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*

Espécie	Solvente extrator (fração)	Concentração (ppm)			
		0	1000	2500	5000
<i>B. pilosa</i>	DCM	118,5 Aa	84 Bc	61,2 Cb	29,1 Dc
	ACT	118,5 Aa	101,2 Aa	100,8 Aa	97,5 Bb
	ML	118,5 Aa	104,2 Aa	101,6 Aa	99,9 Bb
	ACT/ML 1:1	118,5 Aa	109,8 Aa	109,4 Aa	106,4 Aa
	ACT/ML 7:3	118,5 Aa	114,4 Aa	114,5 Aa	110,9 Aa
<i>G. max</i>	DCM	123, Aa	117,6 Aa	115,6 Aa	115,5 Aa
	ACT	123 Aa	118,5 Aa	116,2 Aa	116,2 Aa
	ML	123 Aa	121 Aa	116,4 Aa	116,5 Aa
	ACT/ML 1:1	123 Aa	121,5 Aa	120,1 Aa	118,4 Aa
	ACT/ML 7:3	123Aa	122 Aa	120,4 Aa	120,7 Aa
<i>Z. mays</i>	DCM	219 Aa	182,9 Bb	161,6 Bb	130,2 Cc
	ACT	219 Aa	183,6 Bb	164,5 Bb	131,2 Cc
	ML	219 Aa	182,7 Bb	170,2 Bb	168 Bb
	ACT/ML 1:1	219 Aa	210,1 Aa	196,6 Aa	184,7 Ba
	ACT/ML 7:3	219 Aa	203,7 Aa	198 Aa	188,9 Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os tratamentos aplicados em *G. max* não afetaram a germinação, o crescimento e a produção de biomassa seca nessa espécie. *B. pilosa* foi a que mais sofreu os efeitos da fração DCM, comparativamente com os outros tratamentos. Já *Z. mays* apresentou alterações significativas nas variáveis analisadas em quase todos os tratamentos, demonstrando maior sensibilidade às frações em relação às outras espécies.

As espécies apresentam respostas diferenciadas aos aleloquímicos, uma vez que, eles podem interferir na germinação e/ou desenvolvimento de uma determinada planta e em outra não. Parte dessa resposta se deve à especificidade do aleloquímico, que pode ser tóxico para uma espécie vegetal mas inócuo para outras (Duke *et al.* 1998).

Há interesse em se conhecer o princípio ativo presente em determinados extratos. Para isso, torna-se necessário o fracionamento do extrato bruto vegetal e a identificação dos aleloquímicos presentes (Falkenberg *et al.* 2001). Os bioensaios,

entretanto, mostram redução da atividade inibitória nas frações. Isto pode ser consequência dos efeitos alelopáticos dos extratos brutos, considerando que, normalmente, os efeitos alelopáticos dos extratos brutos resultam mais das atividades sinérgicas de vários aleloquímicos do que a atividade de um produto isolado (Pires & Oliveira 2001). O efeito sinérgico é um dos grandes responsáveis, em alguns casos, do elevado potencial de inibição, pois quando o extrato bruto é fracionado, o poder de inibição pode decrescer pela separação dos compostos químicos, uma vez que alguns compostos químicos são eliminados (Falkenberg *et al.* 2001).

**Tabela 1.9:** Efeito das frações do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) sobre a matéria seca total (g) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*

Espécie	Solvente extrator (fração)	Concentração (ppm)			
		0	1000	2500	5000
<i>B. pilosa</i>	DCM	0,044 Aa	0,031 Bb	0,019 Cc	0,010 Dc
	ACT	0,044 Aa	0,034 Ba	0,025 Bb	0,012 Cc
	ML	0,044 Aa	0,036 Ba	0,028 Bb	0,025 Bb
	ACT/ML 1:1	0,044 Aa	0,043 Aa	0,043 Aa	0,042 Aa
	ACT/ML 7:3	0,044 Aa	0,046 Aa	0,045 Aa	0,043 Aa
<i>G. max</i>	DCM	0,161 Aa	0,152 Aa	0,15 Aa	0,147 Aa
	ACT	0,161 Aa	0,16 Aa	0,152 Aa	0,15 Aa
	ML	0,161 Aa	0,16 Aa	0,16 Aa	0,158 Aa
	ACT/ML 1:1	0,161 Aa	0,16 Aa	0,159 Aa	0,156 Aa
	ACT/ML 7:3	0,161 Aa	0,16 Aa	0,16 Aa	0,159 Aa
<i>Z. mays</i>	DCM	0,361 Aa	0,22 Bb	0,182 Bc	0,148 Cc
	ACT	0,361 Aa	0,224 Bb	0,202Bb	0,181Bb
	ML	0,361 Aa	0,302 Aa	0,303 Aa	0,285Ba
	ACT/ML 1:1	0,361 Aa	0,345 Aa	0,325 Aa	0,321 Aa
	ACT/ML 7:3	0,361 Aa	0,254 Bb	0,227 Bb	0,191 Cb

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Extrato metanólico bruto dos caules de *Kielmeyera variabilis*, por exemplo, apresentou elevado poder como moluscicida natural, e as suas frações hexano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila 1:1, acetato de etila, metanol e metanol:água 1:1 apresentaram atividade reduzida (Pinheiro *et al.* 2004). Em ensaios preliminares, visando à detecção de atividade antitumoral, o extrato bruto dos caules

de *Arrabidaea samyoides* apresentou atividade inibitória do crescimento de linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que as frações purificadas do extrato bruto mostraram uma diminuição da bioatividade (Pauletti *et al.* 2003).

Com *Brachiaria humidicola* foram realizados bioensaios de germinação e crescimento com o extrato bruto e com as frações de hexano, acetato de etila e diclorometano. Assim como foi observado para *B. pilosa* e *Z. mays*, a fração diclorometano de *Brachiaria humidicola* foi a que inibiu com maior intensidade a germinação de *Senna occidentalis* (fedegoso), demonstrando haver nessa fração, componentes químicos ativos com potencial inibitório da taxa germinativa dessa espécie (Souza Filho *et al.* 2005).

Com o extrato metanólico de *C. brasiliense* realizou-se testes de germinação e, com o fracionamento sucessivo do extrato ocorreu a separação dos compostos. De acordo com Moreira (2005), esse fato pôde ser observado pela redução do potencial de inibição. Estes resultados levaram a concluir que o efeito do sinergismo é o grande responsável, em alguns casos, pelo elevado potencial de inibição (Moreira 2005). Através dos fracionamentos realizados com extratos de *C. brasiliense*, obtiveram-se frações que permitiram selecionar aquelas com inibição na atividade do fungo *Cryptococcus neoformans* (Passos *et al.* 2002) e na atividade moluscicida contra o molusco *Biomphalaria glabrata* (Motter *et al.* 2004).

Ao contrário do esperado, o fracionamento do EMF de *C. brasiliense* não causou perda na bioatividade, pelo menos na fração DCM. Todas as frações apresentaram efeitos inibitórios na germinação e no crescimento de *B. pilosa* e *Z. mays*, sendo umas mais ativas que outras. A fração DCM mostrou efeito inibitório na germinação e crescimento de *B. pilosa* e *Z. mays* semelhantes aos do EMF. Provavelmente, os principais aleloquímicos causadores da inibição foram extraídos com o solvente diclorometano, considerando a fração DCM a mais ativa dentre as frações analisadas.

Os efeitos das frações do extrato bruto de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) foram testados na germinação de algumas plantas daninhas como, malícia, malva, mata-pasto e fedegoso. As frações de hexano, diclorometano e aquoso mostraram baixas atividades inibitórias (Souza Filho 2002).

O maior ou menor grau de efeito dos tratamentos com as frações de *C. brasiliense* demonstrou que a atividade biológica dos aleloquímicos presentes,

dependeu tanto da concentração como da sensibilidade da espécie vegetal. Aparentemente, os efeitos dos aleloquímicos das frações não são uniformes e dependem de características das espécies. Neste trabalho, a sensibilidade das espécies estudadas variou na seguinte ordem decrescente: *B. pilosa* > *Z. mays* > *G. max*.

#### 1.4-CONCLUSÕES

O extrato que apresentou maior atividade alelopática foi o extrato metanólico foliar de *C. brasiliense* (EMF).

O EMF inibiu a germinação em *B. pilosa* e *Z. mays*, assim como a velocidade de germinação, o crescimento das plântulas e a produção de matéria seca total nessas espécies. *G. max* foi mais tolerante aos aleloquímicos presentes no EMF em relação à *B. pilosa* e *Z. mays*.

Em *B. pilosa* e *Z. mays*, todas as frações do EMF apresentaram, de certa forma, algum efeito na germinação e crescimento inicial dessas espécies. Em *G. max*, as frações reduziram a germinação, mas não causaram efeito no crescimento inicial.

A fração DCM mostrou a mesma atividade inibitória que o EMF. As frações afetaram a germinação nas espécies estudadas na seguinte ordem de inibição: *Bidens pilosa* (DCM > ACT > ML > ACT/ML1:1 > ACT/ML7:3), *Glycine max* (DCM > ACT > ACT/ML1:1 > ACT/ML7:3ML) e *Zea. mays* (DCM > ML > ACT/ML1:1 > ACT > ACT/ML 7:3).

A fração DCM foi a mais ativa para todas as espécies estudadas.

## CAPÍTULO 2

### RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Bidens pilosa*, *Glycine max* E *Zea mays* SUBMETIDAS AO EXTRATO METANÓLICO DA FOLHA DE *Caryocar brasiliense* E FRAÇÃO DICLOROMETANO

#### 2.1-INTRODUÇÃO

Tem sido comprovado que diversos aleloquímicos atuam sobre atividades vitais das plantas como fotossíntese, síntese de pigmentos, respiração, absorção de nutrientes, síntese de aminoácidos, atividades enzimáticas e estrutura de membrana (Almeida 1990; Siqueira *et al.* 1991; Pires & Oliveira 2001).

Compostos como enecalina, euparina, e dimetilencecalina extraídos das raízes de *Helianthella quinquenervis* (Asteraceae), inibiram a fotossíntese em espinafre (Catañeda *et al.* 1996). Das partes aéreas de *Piqueria trinervia* (Asteraceae) foram isolados monoterpenos, piquerol A e piquerol B, sendo estes compostos inibidores do fluxo de elétrons da fotossíntese (Anaya *et al.* 1996). A cinmetilina, derivado de terpenóide, encontrado em *Artemisia* sp, inibiu o crescimento de plantas daninhas através da interrupção da mitose (Vyvyan 2002).

Alguns aleloquímicos como benzopirano, lactonas, terpenos e fenilpropanóides são inibidores da reação de Hill (Lotina-Hennsen *et al.* 1992). Entre os desacoplantes dos fotossistemas estão algumas fenilcumarinas e lactonas sesquiterpênicas (King-Diaz *et al.* 2001).

Semelhantes a alguns herbicidas comerciais, aleloquímicos com potencial herbicida, são capazes de promover estresse oxidativo em plantas, aumentando a atividade de enzimas como peroxidase, catalase e superóxido dismutase (Yu *et al.* 2003; Pandey *et al.* 2005). Algumas alterações bioquímicas são atribuídas aos aleloquímicos presentes no extrato aquoso de *Cucumis sativus*, como peroxidação de membrana, aumento das enzimas antioxidantes e alterações nas trocas gasosas de *Cucumis sativus* (Yu *et al.* 2003).

O teor de clorofila e do conteúdo de carotenóides também indica o nível de dano que determinado estresse pode estar causando à planta. Nas situações de estresse por herbicidas, as clorofilas totais são destruídas com maior intensidade que os carotenóides, uma vez que esses pigmentos estão relacionados com a defesa da planta (Hendry *et al.* 1987).

Este estudo teve como objetivo estudar a ação alelopática do extrato bruto metanólico da folha de *Caryocar brasiliense* sobre as trocas gasosas, teores de pigmentos e eficiência fotoquímica, além de avaliar os efeitos da fração diclorometano sobre as atividades de enzimas antioxidativas, peroxidação lipídica e permeabilidade de membrana em plantas de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*.

## 2.2-MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento I

**Avaliação dos efeitos do extrato bruto metanólico da folha de *Caryocar brasiliense* (EMF) sobre as trocas gasosas, teores de pigmentos e fluorescência da clorofila *a* em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays***

Plantas de *Bidens pilosa* L., *Glycine max* (linhagem L150) e *Zea mays* (cultivar UFVM100 *Nativo*) foram cultivadas em casa de vegetação em vasos com aproximadamente 3,5 kg de um substrato composto de terra, areia e adubo orgânico (3:1:1).

Os tratamentos com EMF foram realizados no período de verão e iniciados após a emergência do primeiro par de folhas em *B. pilosa* e *G. max* e primeira folha em *Z. mays*. As partes aéreas das plantas foram diariamente pulverizadas (borrifador manual) com 20 mL de soluções de 0, 1000, 2500 e 5000 ppm do EMF no período entre 16:00 e 18:00h.

As medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e a análise de pigmentos foram realizadas em folhas adultas que receberam o EMF durante 30 dias. A fotossíntese (*A*), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração (*E*), a e a relação CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> externo ( $C_i/C_a$ ) foram medidas com um analisador de gases ao infravermelho (IRGA, modelo LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). A fluorescência da clorofila “a” foi medida por um fluorômetro portátil MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Os parâmetros de fluorescência estimados foram o rendimento quântico máximo do PS II ( $F_v/F_m$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR).

Para a determinação dos teores de pigmentos foram retirados 4 discos foliares de 5 mm de diâmetro de cada espécie e tratamento. Os discos foliares de cada amostra foram colocados em frascos protegidos da luz, contendo 5 mL de DMSO 100%, e permaneceram em temperatura ambiente para *B. pilosa* e *G. max*, e 65°C para *Z. mays*, durante 24 h. Decorrido esse tempo, os discos foram separados da

solução, e realizadas as leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 665,1, 649,1 e 480 nm (clorofila a e b e carotenóides, respectivamente) (Wellburn 1994). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de clorofila por  $\text{cm}^2$  de área foliar.

As medições de trocas gasosas e emissão da fluorescência da clorofila “a” foram realizadas em casa de vegetação entre 7:00 e 10:00h, sob irradiância constante de  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *B. pilosa* e *G. max* e,  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *Z. mays*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3, sendo controle mais três níveis de concentração de EMF e três espécies vegetais com quatro repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **Experimento II**

### **Estresse oxidativo em plantas de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays* submetidas à fração diclorometano.**

As determinações foram realizadas em plantas de 30 dias após emergência, mantidas em casa de vegetação.

Para determinar atividade enzimática, peroxidação lipídica e permeabilidade de membrana, discos foliares de 1,4 cm de diâmetro de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays* foram infiltrados a vácuo em solução da fração DCM nas concentrações de 0 e 5000 ppm. Após a infiltração, os discos foram incubados nas respectivas soluções, em placas de Petri durante quatro horas em uma estufa tipo BOD Modelo 3740 (Forma Scientific, Inc. BOX 649 MARIETTA, OHIO 45750) com uma irradiância de  $350 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e a uma temperatura  $25^\circ\text{C}$ . Subseqüentemente, os discos foliares para as análises enzimáticas e peroxidação de lipídeos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para a determinação da atividade da peroxidase, da catalase e da dismutase do superóxido 0,1 g de discos de tecido foliar foram macerados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidina (PVPP) 1% (p/v), em almofariz de porcelana (Peixoto *et al.* 1999). O homogeneizado foi centrifugado a  $15.000 \times g$  por 15 minutos, a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto. Todas as soluções foram mantidas entre 0 e  $4^\circ\text{C}$ .

A atividade das peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Para *Z. mays*, a alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foi diluído para 1:25 (v/v) com meio de reação (Peixoto *et al.* 1999). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento na absorbância a 420 nm, no primeiro minuto de reação, à 25°C. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e, expressa em mmoles de purpurogalina  $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  MF (Chance & Maehley 1955).

A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM (Peixoto *et al.* 1999). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a 30°C, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 36  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , e expressa em mmoles de peróxido de hidrogênio  $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  MF (Anderson *et al.* 1995).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de  $\rho$ -nitro tetrazólio (NBT), 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (Del Longo *et al.* 1993). A reação foi conduzida numa câmara fechada com o interior revestido com papel alumínio, contendo uma lâmpada fluorescente de 15 W. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pelo incremento na absorbância a 560 nm. Para o “branco” utilizou-se a mesma mistura da reação anterior, mas o sistema foi mantido no escuro. A atividade enzimática foi expressa em unidade SOD, definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridoch 1971).

A peroxidação de lipídeos foi determinada em discos foliares da parte aérea pesando 200 mg, os quais foram macerados em 4 mL de ácido tricloacético (TCA) 0,1% (p/v) em almofariz de porcelana. O material obtido foi centrifugado a 10.000  $\text{gx}$  por 15 min. e, coletado o sobrenadante. Em seguida, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5%

(TBA) (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria à 95°C por 30 min., sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo e a absorbância medida a 532 e 600 nm. A absorbância a 600 nm foi subtraída da absorbância a 532 nm e, a concentração de malonaldeído (MDA) foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Heath & Packer 1968).

A permeabilidade de membrana foi determinada em discos foliares de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*, por meio do extravasamento de eletrólitos (Tarhanen *et al.* 1999). Os discos foliares foram colocados em tubos de ensaio contendo 40 mL de água MilliQ, por 6 horas, e medida a condutividade inicial (i) através de condutímetro (McCann & Solomoon 2000). Os tubos de ensaio foram transferidos para estufa a 90°C, por 2 horas e medida a condutividade final (f). A permeabilidade de membrana foi estimada por meio da relação  $i/(i+f)*100$  (Tarhanen *et al.* 1999) e, expressa em porcentagem de condutividade iônica total.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, sendo controle e um nível de concentração da fração DCM e três espécies vegetais com quatro repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 2.3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I

**Efeitos do extrato bruto metanólico da folha de *Caryocar brasiliense* (EMF) sobre as trocas gasosas, teores de pigmentos e fluorescência da clorofila a em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays***

O EMF reduziu a fotossíntese em *B. pilosa* a partir da concentração de 1000 ppm (Fig. 2.1). Na concentração de 5000 ppm, observou-se o maior efeito do EMF em A, que sofreu redução de 46% e, foi significativamente maior que nas outras concentrações de EMF (Fig.2.1). Em *G. max*, A não foi influenciada por nenhuma das concentrações do EMF (Fig.2.1). Em *Z. mays*, observou-se redução significativa apenas a partir da concentração de 2500 ppm (Fig.2.1). O efeito na concentração de 5000 ppm foi ainda maior que a de 2500 ppm (Fig.2.1).

A  $g_s$  aumentou em *B. pilosa* em todas as concentrações do EMF estudadas (Fig.2.1). Os aumentos foram de 29, 74, e 103% nas concentrações de 1000, 2500 e 5000 ppm, respectivamente. A  $g_s$  em *G. max*, à semelhança do que aconteceu com A,

também, não sofreu qualquer influência do EMF (Fig.2.1). Em *Z. mays*, apenas a partir da concentração de 2500 ppm, observou-se redução significativa, sendo que na concentração de 5000 ppm a redução foi de 21% e, significativamente menor que a de 2500 ppm (Fig.2.1).

Em *B. pilosa* observou-se aumento significativo de *E* em todas as concentrações do EMF (Fig.2.1). Os aumentos foram de 36%, 56% e 80% nas concentrações de 1000, 2500 e 5000 ppm, respectivamente.

A transpiração em *G. max*, novamente, não foi influenciada pelo EMF (Fig.2.1).

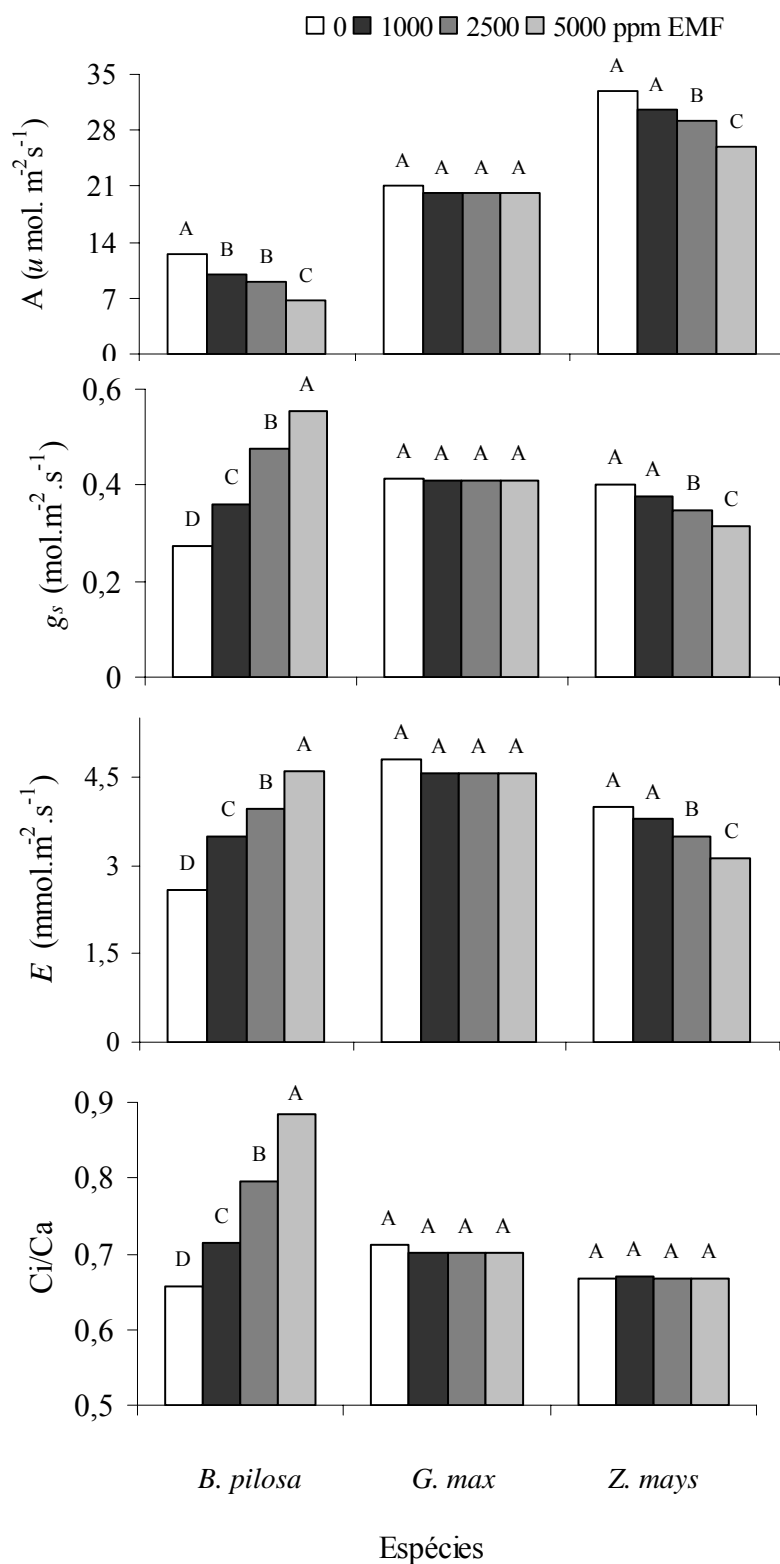
Em plantas de *Z. mays*, a *E* reduziu significativa a partir da concentração de 2500 ppm e esta redução aumentou ainda mais na concentração de 5000 ppm, em cerca de 22% (Fig.2.1).

A relação  $C_i/C_a$  em *B. pilosa* aumentou significativamente em todas as concentrações de EMF (Fig.2.1). Em *G. max* e em *Z. mays*, a relação  $C_i/C_a$  não apresentou diferença significativa (Fig.2.1).

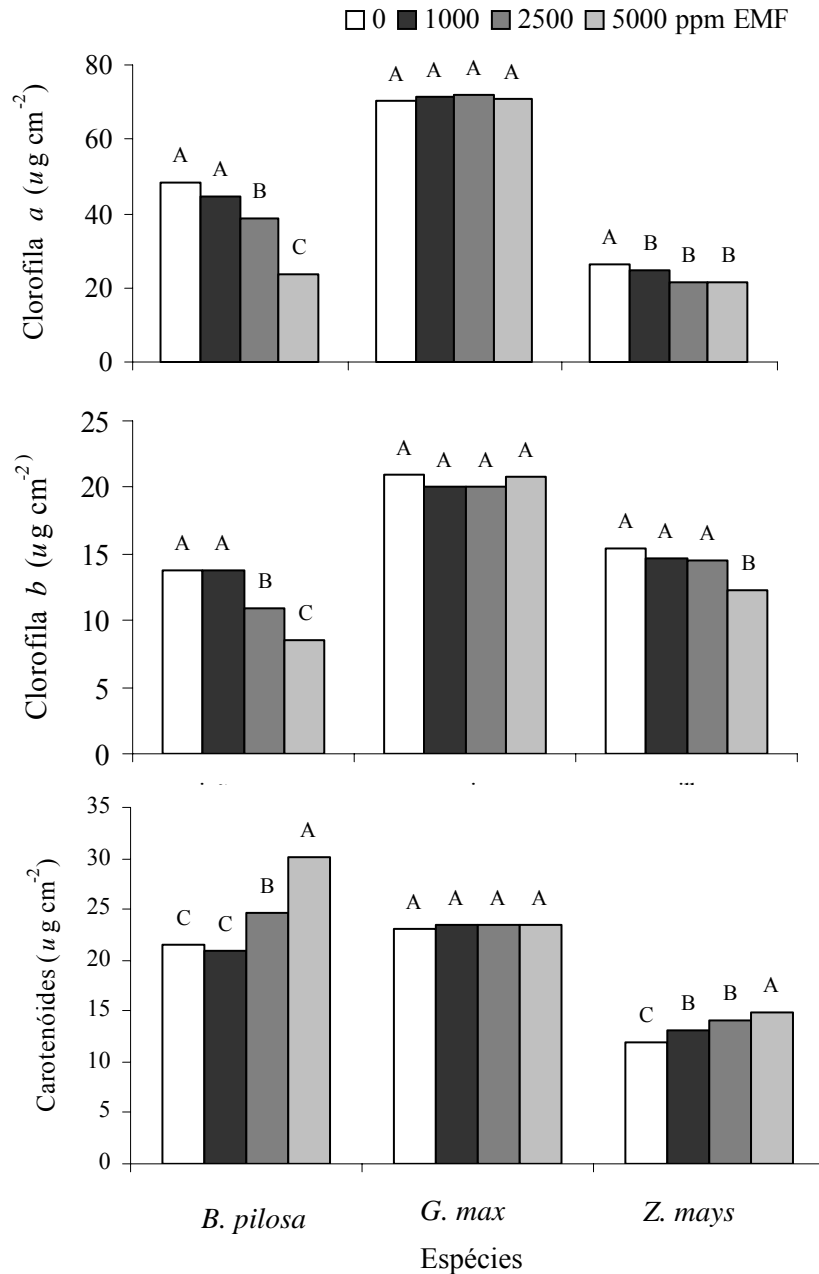
Não houve diferença significativa no teor de clorofila *a* em *B. pilosa* na concentração de 1000 ppm de EMF (Fig.2.2). Observou-se um decréscimo significativo de 20% na concentração de 2500 ppm. Redução mais acentuada foi observada na concentração de 5000 ppm, na ordem de 52% (Fig.2.2). O teor de clorofila *b* reduziu significativamente nas concentrações de 2500 e 5000 ppm (Fig.2.2). O conteúdo de carotenóides aumentou significativamente em todas as concentrações de EMF estudadas (Fig.2.2).

Os aleloquímicos presentes no EMF não afetaram os teores de pigmentos em *G. max*. (Fig.2.2).

Em *Z. mays*, observou-se um decréscimo médio de 20% no teor de clorofila *a* com a aplicação do tratamento, mas não houve diferença entre as concentrações de EMF (Fig.2.2). O teor de clorofila *b* decresceu apenas na concentração de 5000 ppm, em 20% (Fig.2.2). A concentração de carotenóides aumentou em média 11% nas concentrações de 1000 e 2500 ppm, enquanto que, na concentração de 5000 ppm, houve um aumento significativo de 16% (Fig.2.2).

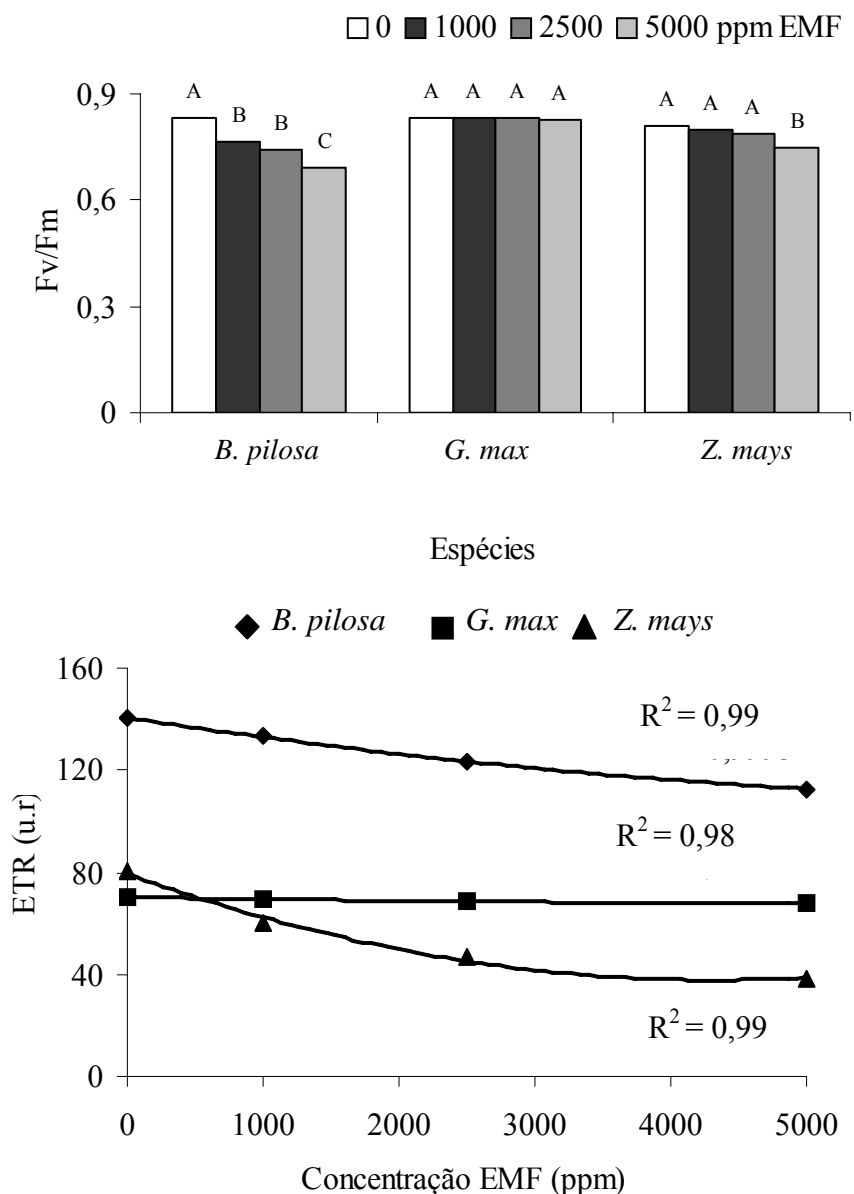


**Figura 2.1:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na fotossíntese ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e relação  $C_i/C_a$  de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 2.2:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) no teor de clorofila *a* e *b* e conteúdo de carotenóides de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A fluorescência da clorofila “a” ( $F_v/F_m$ ) em *B. pilosa* apresentou redução média de 8% nas concentrações de 1000 e 2500 ppm (Fig.2.3). O aumento na concentração do EMF para 5000 ppm, resultou na redução significativa de  $F_v/F_m$  em até 16% (Fig.2.3). A taxa de transporte de elétrons (ETR) também sofreu redução à medida que se aumentavam as concentrações do EMF. Na concentração de 5000 ppm foi observado um valor máximo de 20% de redução (Fig.2.3).



**Figura 2.3:** Efeito do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na fluorescência da clorofila “a” (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) e taxa de transporte de elétrons (ETR) de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados da maioria dos experimentos mostraram que houve um efeito do EMF sobre os processos fotossintéticos. A fotossíntese pode ser inibida de diversas formas, sendo a mais freqüente, a diminuição do fluxo de CO<sub>2</sub> para os sítios de carboxilação decorrentes do fechamento dos estômatos. Um segundo fator se relaciona com o transporte de elétrons na membrana dos tilacóides durante a formação do poder redutor. Um último fator, está relacionado com o transporte e com o aproveitamento dos fotoassimilados que poderiam inibir a fotossíntese por

acúmulo de produto final (Taiz & Zeiger 2002). Os experimentos realizados abordaram os efeitos do EMF sobre o movimento estomático, o teor de pigmentos e as reações fotoquímicas medidas pela fluorescência da clorofila *a*.

O efeito de EMF sobre *A* e *E* foi significativo em *B. pilosa* e *Z. mays*. Os mecanismos de ação de EMF em ambas as espécies mostrou-se diferente. Enquanto a inibição de *A* em *Z.mays* foi dependente do fechamento dos estômatos, em *B. pilosa* foi condicionada à diminuição do teor de clorofila. É possível que o EMF tenha atuado na destruição da clorofila. A diminuição dos pigmentos foliares afetou a eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) em *B. pilosa*, o que poderia induzir a um estresse oxidativo.

Em *Z. mays* o EMF induziu o fechamento dos estômatos afetando *A* e *E*, entretanto, a relação  $C_i/C_a$  não sofreu uma redução significativa, o que poderia ser explicado pelo metabolismo C4 do milho já que os teores de clorofila, a eficiência quântica e ETR foram afetados apenas na concentração 5000 ppm de EMF.

*G. max* mostrou uma alta tolerância aos efeitos de EMF sobre os processos fotossintéticos o que pode significar que o EMF, provavelmente, foi inativado, metabolizado ou não absorvido.

Estudos realizados em outras espécies mostraram que aleloquímicos atuaram sobre o funcionamento das células-guarda. Algumas toxinas produzidas por fungos, causaram paralisia estomática ocasionando o murchamento na espécie hospedeiro, levando-a à morte (Larcher 2004). Fusicoccina, toxina produzida por *Fusicoccum amygdali*, promoveu a abertura permanente dos estômatos em *Phaseolus vulgaris*, devido a um aumento de  $K^+$  nas células-guarda (Turner 1973). Toxina produzida por *Helminthosporium victoriae*, victorina, promoveu paralisia estomática em plantas de *Avena sativa* (Turner 1972). Provavelmente o aumento da condutância estomática em *B. pilosa* pode estar relacionado com uma limitação no controle estomático, ocasionado pelas substâncias químicas presentes no EMF. Outros aleloquímicos como juglona em *Z. mays* (Jose & Gillespie 1998), ácidos caféico, ferúlico, e gálico em *G.max* (Patterson 1981), escopoletina em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), girassol (*Helianthus annuus*) e caruru (*Amaranthus retroflexus*) (Einhellig 1986) inibiram a fotossíntese por fechamento de estômatos.

Os teores de pigmentos não foram alterados em *G. max* quando tratada com o EMF. O mesmo não foi observado em plantas dessa espécie tratadas com ácidos ferúlico, *p*-cumárico, caféico, *t*-cinâmico, gálico e vanílico havendo uma redução

significativa nos teores de clorofila em relação às plantas do tratamento controle (Patterson 1981). Nesse caso, o autor sugeriu que a redução da clorofila pode ter sido devida a um aumento na sua degradação ou a uma inibição da síntese de Mg-porfirina pelos aleloquímicos.

Nos estudos com aleloquímicos, a degradação da clorofila tem sido relacionada como um dos sintomas da interferência destas substâncias sobre as plantas (Rice 1984; Singh *et al.* 2002). Contudo, ainda não está claro o mecanismo pelo qual ocorre a redução da clorofila quando tratadas com aleloquímicos, podendo haver dois fatores para essa causa: degradação da clorofila ou inibição da síntese de clorofila. Porém, a única confirmação realizada nesses estudos, é o fato da redução no teor de clorofila afetar drasticamente as taxas fotossintéticas, comprometendo o desenvolvimento das plantas (Yu *et al.* 2003).

Provavelmente, a redução do conteúdo de clorofila em *B. pilosa* e *Z. mays* contribuiu para uma menor taxa fotossintética nessas espécies, como o observado em plantas de *B. pilosa* tratadas com partenina, aleloquímico produzido por *Parthenium hysterophorus* (Batish *et al.* 2002). Em *Lemma minor*, o teor de clorofila e a taxa fotossintética reduziram significativamente, quando a espécie foi tratada com juglona, aleloquímico extraído de *Juglans nigra* (Hejl *et al.* 1993).

No caso de *B. pilosa* e *Z. mays*, houve um aumento na síntese de carotenóides, refletida no aumento do conteúdo desse pigmento, demonstrando que essas espécies utilizam desse mecanismo como modo de defesa contra os aleloquímicos presentes no EMF.

Sorgoleone, aleloquímico produzido pelo sorgo (*Sorghum bicolor*), provou também ser potente inibidor do transporte de elétrons do PSII em cloroplastos isolados de espinafre (Gonzalez *et al.* 1997). Estudos mais detalhados dos mecanismos de ação de aleloquímicos, comprovaram que a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana dos tilacóides e a cadeia de transporte de elétrons do PSII foram inibidos pelo xantorrizol, aleloquímico extraído de *Iostephane heterophylla* (Gonzalez-Bernardo *et al.* 2003). Alguns aleloquímicos como lactonas, terpenos, cumarinas, flavonóides, fenilpropanóides e benzofuranos atuam como inibidores fotossintéticos e, compostos como benzopiranos, lactonas, terpenos e fenilpropanóides atuam como inibidores da reação de Hill. (King-Diaz *et al.* 2001). É possível que, aleloquímicos presentes no EMF podem estar atuando no processo fotossintético em *B. pilosa* e *Z. mays* através de mecanismos de ação semelhantes aos aleloquímicos já estudados.

Assim como observado para *B. pilosa* e *Z. mays*, a relação  $F_v/F_m$  sofreu reduções significativas em espinafre, quando o mesmo foi submetido ao tratamento com o aleloquímico xantorrizol (González-Bernardo *et al.* 2003). A redução de  $F_v/F_m$  em plantas de *B. pilosa* e *Z. mays*, indicou haver uma redução na quantidade de energia aproveitada por essas espécies para realização dos processos fotoquímicos, como a produção de ATP e redução de NADPH.

A relação  $F_v/F_m$  também foi reduzida significativamente em plantas de *Euphorbia esula*, quando tratadas com ácido caféico (Barkosky *et al.* 2000). Os autores consideraram que a alteração ocorrida na emissão da fluorescência da clorofila “a” foi um mecanismo de ação secundária do ácido caféico, uma vez que a integridade da membrana foi também alterada, ocasionando uma série de reações negativas, como danos ao aparato fotossintético, refletido pela redução de  $F_v/F_m$ .

Alterações na fluorescência podem demonstrar a ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético, permitindo avaliar o estado do transporte eletrônico e a preparação do gradiente protônico necessário à síntese do ATP (Krause e Weiss, 1988; Larcher 2004).

Provavelmente, as substâncias químicas presentes no EMF comprometem de alguma forma, a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, seja bloqueando o fluxo de elétrons ou competindo com receptores dos fotossistemas. Esse fato pôde ser comprovado pela redução da fluorescência da clorofila “a” e ETR em *B. pilosa* e *Z. mays*, demonstrando que o fluxo de transporte de elétrons de alguma forma foi alterado e que provavelmente, houve impedimento da produção de ATP e NADPH, importantes para a fixação de  $CO_2$  na etapa bioquímica. Dessa forma, a fixação de  $CO_2$  nessas espécies tornou-se comprometida, pela ausência de energia, representada pela molécula de ATP, e de poder redutor, representada pelo NADPH (Hall *et al.* 1993).

## **Experimento II**

### ***Estresse oxidativo em plantas de Bidens pilosa, Glycine max e Zea mays submetidas à fração diclorometano.***

A atividade da peroxidase sofreu aumento de 55 e 19% em *B. pilosa* e *Z. mays* ao serem tratadas com a fração DCM na concentração de 5000 ppm, respectivamente (Fig.2.4). A atividade dessa enzima não foi alterada em *G. max* (Fig.2.4).

A atividade da catalase sofreu redução de 32 e de 43% em *B. pilosa* e *Z. mays*, respectivamente (Fig.2.4), mas não foi influenciada pelo tratamento com a fração DCM em *G. max* (Fig.2.4).

A atividade da superóxido dismutase aumentou 53 e 35% em *B. pilosa* e *Z. mays*, respectivamente (Fig.2.4). Em *G. max*, também não se observou efeito da fração DCM na atividade dessa enzima (Fig.2.4).

A peroxidação lipídica, com base na concentração de MDA, aumentou em 39 e 76% em *B. pilosa* e *Z. mays* pelo tratamento com a fração DCM, respectivamente (Fig.2.5). Em *G. max* não se observou efeito significativo do tratamento sobre a produção de MDA (Fig.2.5).

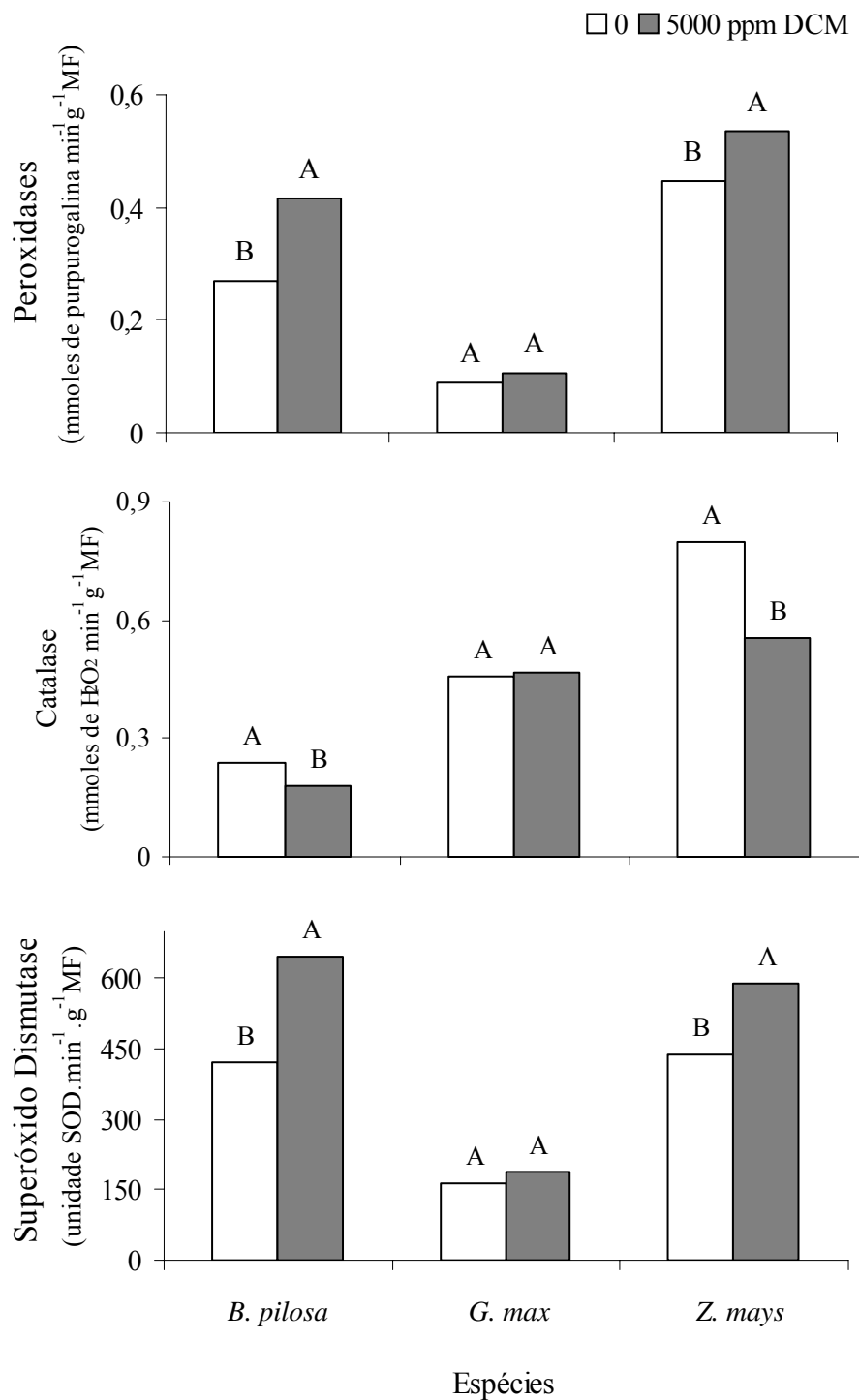
A permeabilidade das membranas, com base no extravasamento de eletrólitos, aumentou 58 e 35% em *B. pilosa* e *Z. mays*, respectivamente, com o tratamento com a fração DCM (Fig. 2.6). Em *G. max*, não se observou diferença significativa no extravasamento de eletrólitos (Fig. 2.6).

O aumento da atividade da POX e da SOD em *B. pilosa* e em *Z. mays*, sugere que os aleloquímicos da fração DCM podem estar causando estresse oxidativo nessas espécies. Em *G. max* não houve modificações nas atividades das enzimas POX e SOD e, portanto, parece que a fração DCM não provocou estresse oxidativo nessa espécie. Diferentemente, *G. max* tratada com ácido benzóico e cinâmico, mostrou aumento significativo dessas enzimas (Baziramakenga *et al.* 1995), o que sugere que os aleloquímicos presentes na fração DCM do EMF não atingiram os níveis de tolerância nessa espécie.

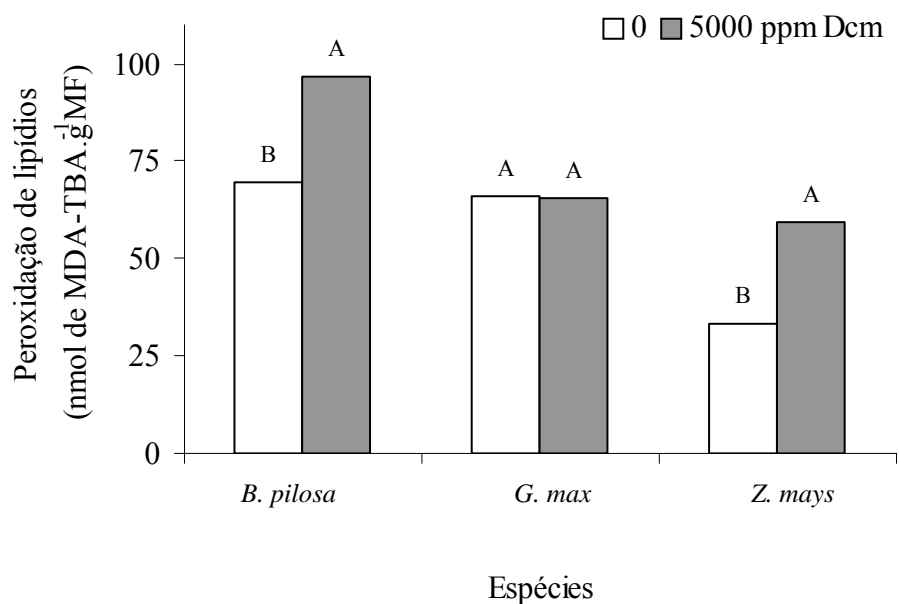
O aumento na atividade de SOD, indica que houve aumento na produção de  $O_2^-$ . Como a SOD transforma os  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , que é substrato das enzimas POX e CAT, observou-se paralelamente, aumento na atividade de POX, na tentativa de eliminação desse subproduto.

A atividade da POX é, frequentemente, aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções da enzima (Siegel 1993). A atividade de CAT, entretanto, decresceu tanto em *B. pilosa* quanto em *Z. mays*. Isto se deve, provavelmente, ao fato da CAT ter localização muito restrita e ter baixa afinidade pelo substrato. Assim, a participação da CAT no mecanismo de eliminação de  $H_2O_2$  pode ser bem limitada, como sugerem Cakmak *et al.* (1993) e Siegel (1993). O aumento observado na atividade da POX em *B. pilosa* e *Z. mays*, associado a uma eficiente eliminação de  $H_2O_2$ , parece ter resultado em

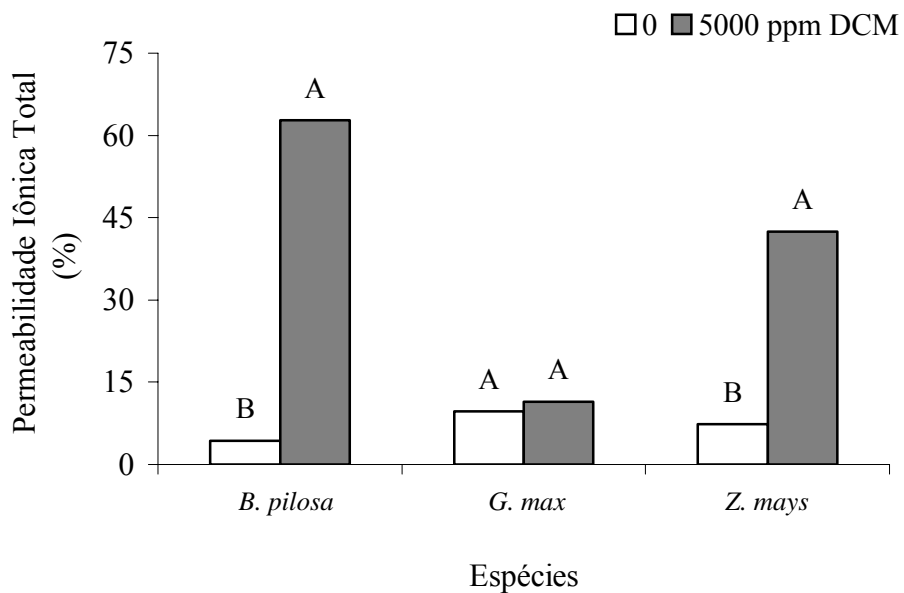
menor disponibilidade de  $H_2O_2$  para a catalase, com conseqüência, a redução na sua atividade.



**Figura 2.4:** Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na atividade de peroxidase, catalase e superóxido dismutase nas espécies de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 2.5:** Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na peroxidação de lipídeos nas espécies de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 2.6:** Efeito da fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense* (EMF) na permeabilidade de membrana nas espécies de *B. pilosa*, *G. max* e *Z. mays*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas plantas, intermediários reativos de oxigênio (ROIs) podem ser produzidos em decorrência de diversas perturbações ambientais, como por exemplo, excesso de luz, seca, temperaturas elevadas, herbicidas e, até mesmo, substâncias químicas naturais como os aleloquímicos (Rice 1984; Yu *et al.* 2003; Pandey *et al.* 2005).

Alguns aleloquímicos, como benzopiranos, terpenos e fenilcumarinas apresentam a mesma capacidade oxidativa do herbicida comercial paraquat, que age recebendo elétrons do receptor primário do PSI para formar radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ). A formação de ROIs, como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peridroxil ( $O_2H^{\bullet}$ ), também são produzidos nos cloroplastos quando os elétrons são transferidos diretamente do PSI para o oxigênio (Alscher *et al.* 2002).

A desintoxicação dos radicais superóxidos pela enzima superóxido dismutase, resulta na formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que, caso não seja rapidamente eliminado pelo metabolismo, pode causar peroxidação de lipídeos e danificar membranas de cloroplasto e de células (Scandalios 1993; Ferri *et al.* 2001; King-Diaz *et al.* 2001).

O aumento da peroxidação lipídica em decorrência da ação de substâncias químicas presentes na fração DCM foi constatada indiretamente pelo monitoramento de atividades enzimáticas. Na presença de DCM, o aumento da atividade da SOD em *B. pilosa* e *Z. mays* contribuiu para a redução dos níveis de  $O_2^-$ , porém, não foi suficiente para evitar a peroxidação de lipídeos nessas espécies.

Estudos indicam que injúrias causadas às membranas por herbicidas e aleloquímicos, podem estimular a produção de radicais livres, promovendo a peroxidação de lipídeos das membranas, resultando em modificações na sua estrutura e nas suas funções (Inderjit *et al.* 1995).

O aumento de extravasamento de eletrólitos em *B. pilosa* e *Z. mays* indicou ter havido alteração na permeabilidade da membrana. Ao que tudo indica, essa alteração pode ter sido resultado da peroxidação de lipídeos atribuídas às formas de ROI's, pelo tratamento com a fração DCM. Semelhante ao observado para *B. pilosa* e *Z. mays*, a permeabilidade de membrana de discos foliares de *Cucumis sativus* foi alterada quando tratados com dehydrozalinin C, lactona sesquiterpênica isolada da raiz de espécies da família Compositae (Galindo *et al.* 1999). O aumento do

extravasamento de eletrólitos em folhas tratadas com herbicidas e aleloquímicos foi considerado bom indicativo de danos na membrana celular (Duke & Abbas, 1995).

Diferente dos resultados obtidos aqui em *G. max*, que tratadas com a fração DCM não sofreu interferência sobre o extravasamento de eletrólitos, essa espécie quando tratada com ácidos benzóico e cinâmico apresentou aumento no extravasamento de eletrólitos e na produção de MDA, ocasionando peroxidação de lipídeos (Baziramakenga *et al.* 1995).

Muitos trabalhos têm relatado alterações na permeabilidade da membrana em plantas expostas a aleloquímicos (Friebe *et al.* 1997; Tarhanen *et al.* 1999). Os aleloquímicos causam danos às membranas celulares por interação direta dessas substâncias com a estrutura da membrana, ou por destruição de algum metabólito necessário à manutenção de sua função (Rice 1984). Aparentemente, a membrana plasmática parece ser o sítio primário de ação dessas substâncias, desenvolvendo a partir de então, uma série de reações fisiológicas e bioquímicas (Galindo *et al.* 1999).

## **2.4-CONCLUSÕES**

As trocas gasosas, os teores de pigmentos, a fluorescência da clorofila “a” e a taxa de transporte de elétrons foram afetados significativamente pelo EMF em *B. pilosa* e *Z. mays*.

Os aleloquímicos presentes na fração DCM induziram ao estresse oxidativo em *B. pilosa* e *Z. mays*, ocasionando aumento na atividade de enzimas antioxidativas, como POX e SOD, extravasamento de eletrólitos e peroxidação lipídica.

Dentre as espécies estudadas, *G. max* demonstrou ser mais tolerante ao EMF e à fração DCM não havendo alteração nas variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas.

## CAPÍTULO 3

### IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Caryocar brasiliense*

#### 3.1-INTRODUÇÃO

Os processos de fracionamento de extratos vegetais, com intuito de isolamento de substâncias ativas, podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica (Dey & Harborne 1991). Mais recentemente, vem sendo utilizado o monitoramento das frações de extratos vegetais por cromatografia em coluna, seguida de cromatografia gasosa (CG), ou de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta e espectrômetro de massa (CLAE/UV/EM), ou de ressonância magnética nuclear (CLAE/RMN). Essa combinação possibilita direcionar as operações de fracionamento para o isolamento daqueles compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos (Hostettmann *et al.* 1997).

Entre os métodos físicos utilizados na determinação estrutural, a espectrometria de massas e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) constituem os mais amplamente empregados (Collins *et al.* 1997). Um aparelho de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (CG/EM) permite a identificação mais precisa e detalhada de compostos químicos vegetais e a quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas (Falkenberg *et al.* 2001). A espectrometria no infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que auxilia na identificação dos compostos, principalmente, na confirmação da presença ou ausência de grupos funcionais. Essa técnica se baseia no fato de que as ligações químicas possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (Collins *et al.* 1997).

O objetivo desse trabalho foi identificar os compostos químicos presentes na fração diclorometano do extrato bruto metanólico da folha de *Caryocar brasiliense*, através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa e espectroscopia de infravermelho.

### 3.2-MATERIAL E MÉTODOS

A identificação dos compostos presentes na fração diclorometano (DCM) foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), através de um aparelho SHIMADZU QP 50000, com energia de impacto de 70 eV, coluna DB5 de 30 m, 0,25 mm de d.i., 0,25 µm de espessura de filme e, com o seguinte programa de aquecimento: 50°C (5 min); 250°C (16°C/min); 250°C (30 min). A temperatura do injetor e detector foram de 220°C e 250°C, respectivamente.

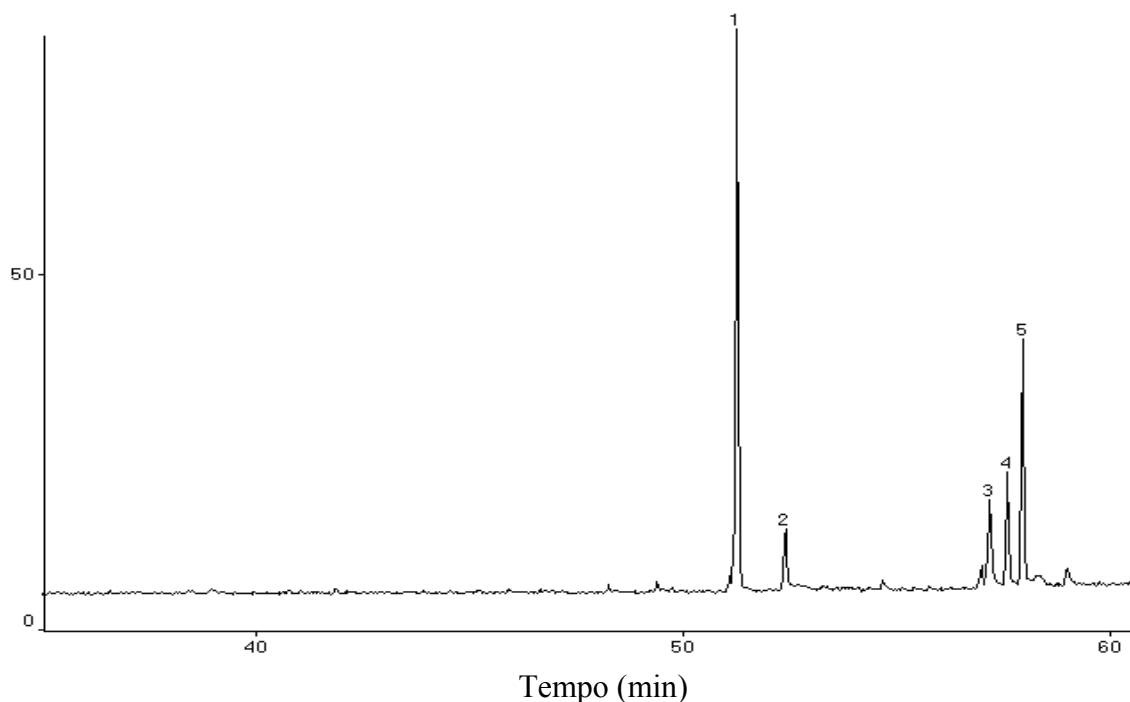
Para a análise através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), utilizou-se 10 mg da massa concentrada da fração diclorometano misturada em 100 mg de KBr. Essa mistura foi triturada e prensada a altas pressões e, aplicada no aparelho de IVTF PERKIN ELMER PARAGON 1000. A identificação dos compostos foi baseada em biblioteca de espectros de massas Wiley 139 do próprio aparelho CG/EM e, em Índice de Kovat.

### 3.3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fração diclorometano (DCM) foram identificados, através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM), os seguintes compostos químicos: palmitato de metila (1), ácido palmítico (2), elaidato de metila (3), álcool insaturado trans-fitol (4) e estearato de metila (5). A Figura 3.1 representa o cromatograma da fração extraída pelo diclorometano e os compostos identificados, e suas possíveis estruturas estão indicados na Tabela 3.1.

Sabe-se que alguns óleos essenciais apresentam elevada atividade biológica contra herbívoros e patógenos, além de apresentar atividade farmacológica (Werker 1993; Duke 1994). Além disso, algumas substâncias constituintes dos óleos essenciais, como 2-heptenona, *p*-cymeno e *p*-cymen-9-ol, extraídos de *Amaranthus palmeri* e *Proboscidea lousianica* encontram-se diretamente envolvidos com a inibição da germinação e crescimento em outras espécies (Riffle *et al.* 1991).

Óleo essencial identificado em *P. lousianica* apresentou componente semelhante ao de *C. brasiliense*, como ácido hexadecanóico. Essa substância, extraída de *P. lousianica* apresentou atividade inibitória na germinação de *Allium cepa* e *Lycopersicon esculentum* (Riffle *et al.* 1991).



**Figura 3.1:** Cromatograma do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense* (EMF) obtido após fracionamento cromatográfico usando solvente diclorometano. Palmitato de metila (1), ácido palmítico (2), elaidato de metila (3), álcool insaturado trans-fitol (4) e estearato de metila (5).

**Tabela 3.1:** Compostos identificados na fração diclorometano (DCM) do extrato metanólico da folha de *Caryocar brasiliense* (EMF).

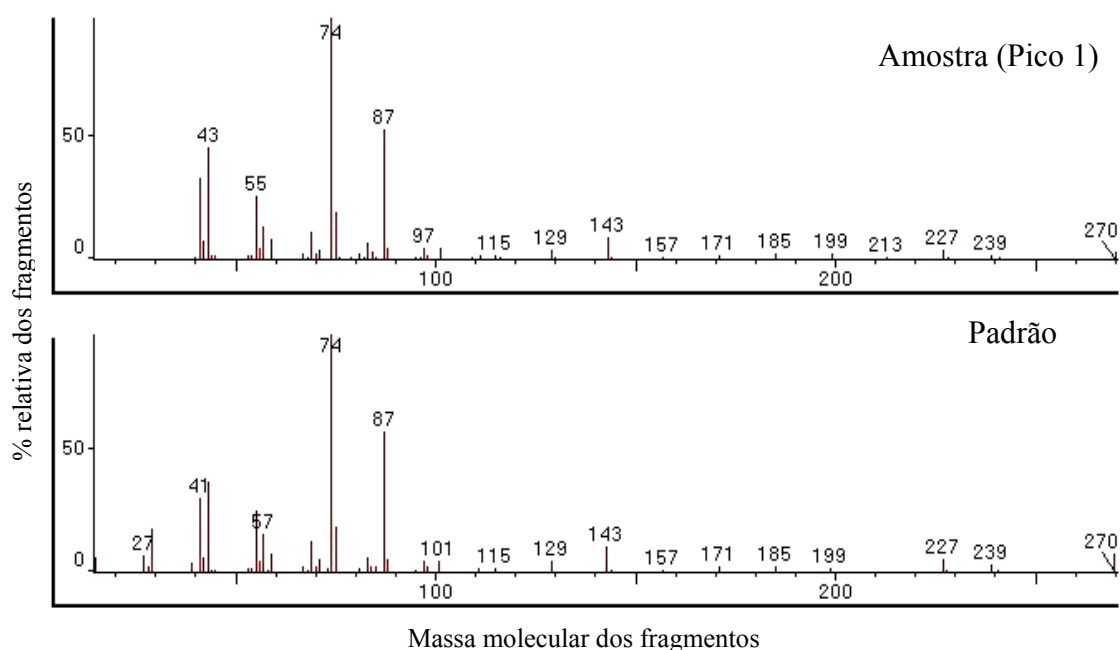
<i>índice</i>	<i>Estrutura</i>	<b>Nome usual</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Pico (%)</b>
1		Hexadecanoato de metila "Palmitato de metila"	52,28	48,12
2		Ácido hexadecanóico "Ácido palmítico"	52,40	9,27
3		(E) - octadec-9-enoato de metila "Elaidato de metila"	57,19	10,15
4		(E)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol "Trans-fitol"	57,61	11,15
5		Octadecanoato de metila "Estearato de metila"	57,98	21,30

Através de CG-EM, foram identificados componentes de óleos essenciais, como hexadecanoato de metila, no extrato metanólico de *Hibiscus cannabinus*, o qual apresentou fitotoxicidade em *Lactuca sativa* e atividade antifúngica em *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae* e *C. accutatum* (Kobaisy *et al.* 2001).

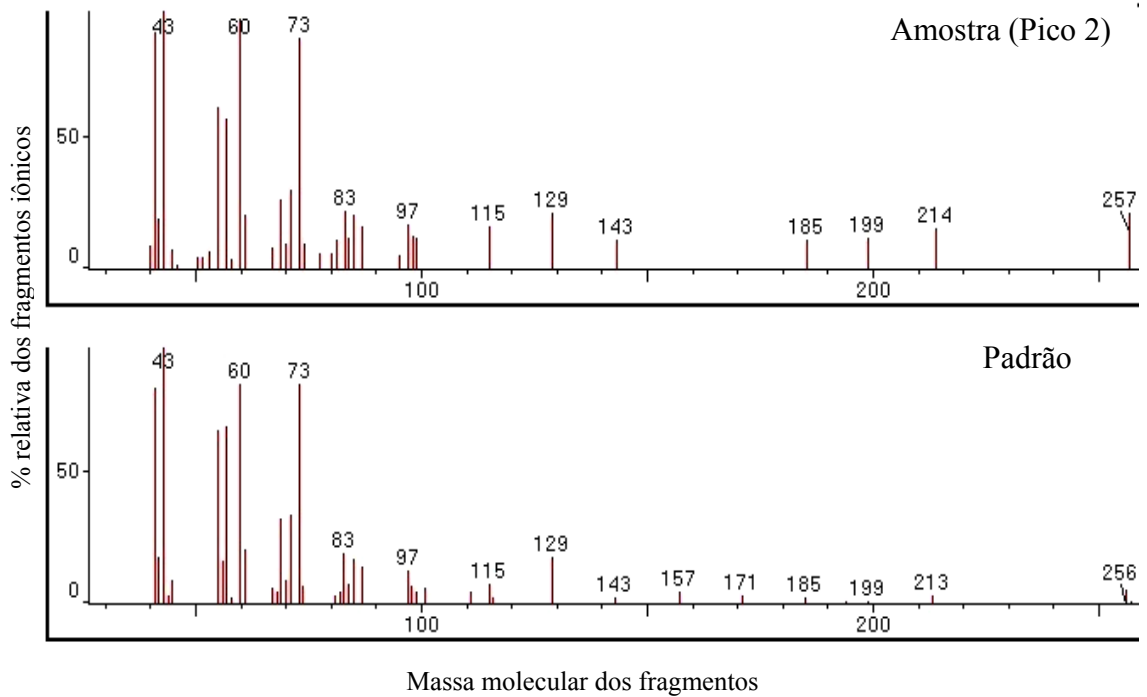
Em extrato hexânico do cerne da raiz de *Strychnos guianensis* foram identificados palmitato de metila, estereato de metila e nonadecanoato de metila. Provavelmente, essas substâncias são responsáveis pela característica farmacológica dessa espécie, como atividade antimalárica, anti-anêmica, anti-cancerígena e ação febrífuga, porém, poucos são os relatos na literatura sobre a ação alelopática dessas substâncias (Pinheiro *et al.* 2004).

Na fração DCM da folha de *C. brasiliense* foram encontradas as mesmas substâncias, com ênfase em palmitato de metila, composto químico majoritário, seguido do estereato de metila, que também apresenta uma porcentagem elevada (Tab.3.1). Provavelmente, as substâncias encontradas na fração DCM foram responsáveis pelas alterações ocorridas na germinação e crescimento em *B. pilosa* e *Z. mays*.

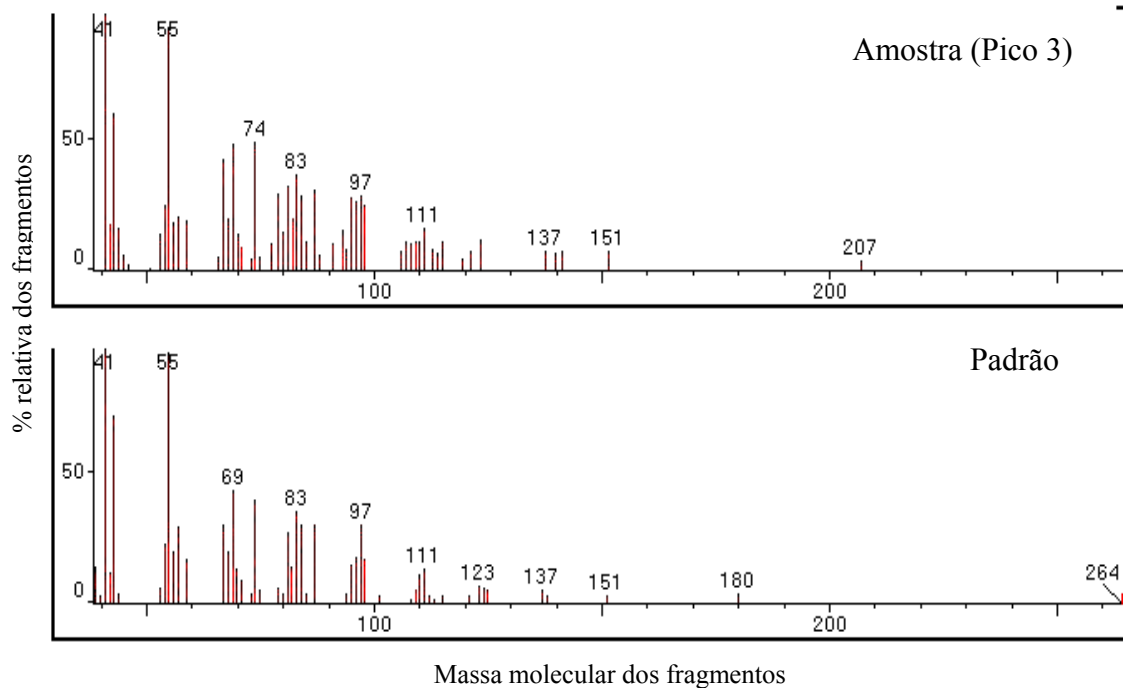
Nas figuras 3.2-3.6, observam-se os espectros de massa dos componentes da fração DCM do extrato metanólico da folha de *C. brasiliense*.



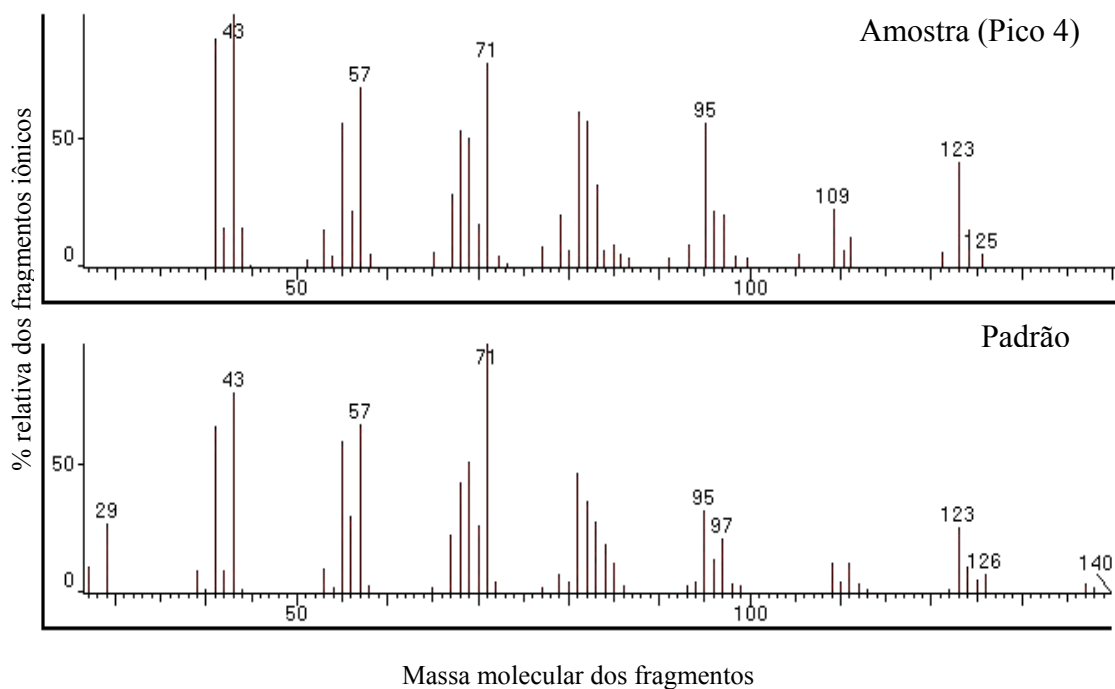
**Figura 3.2:** Hexadecanoato de metila (palmitato de metila). Espectro de massas do componente 1 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do palmitato de metila (padrão).



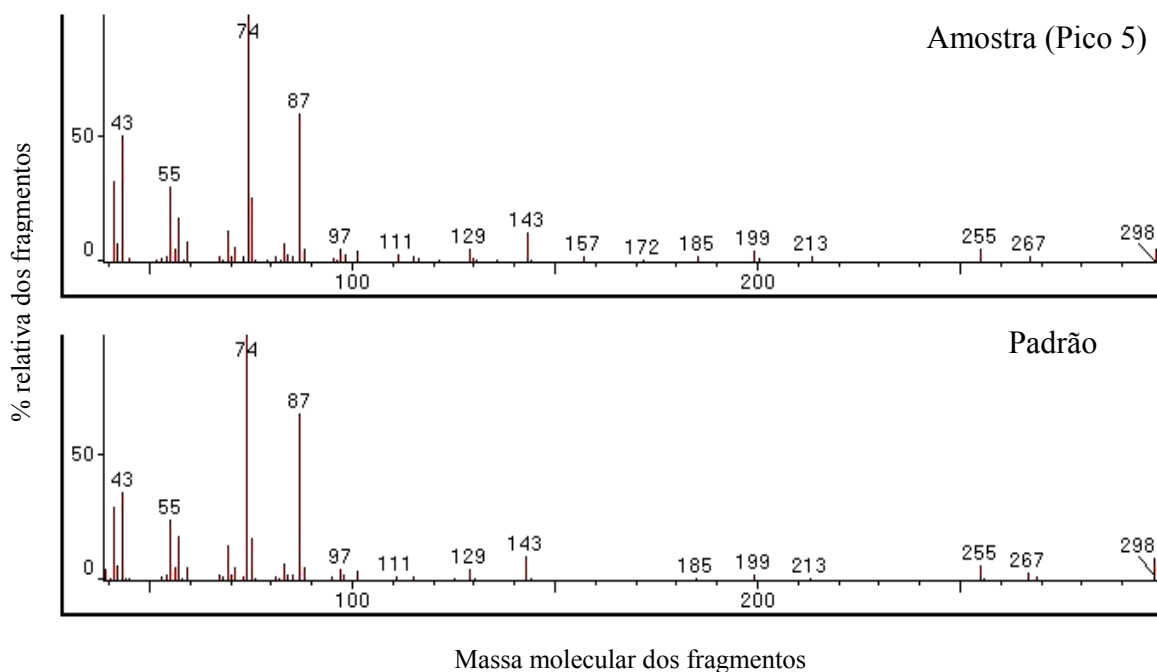
**Figura 3.3:** Ácido hexadecanóico (ácido palmítico). Espectro de massas do componente 2 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do ácido palmítico (padrão).



**Figura 3.4:** (*E*)-octadec-9-enoato de metila (elaidato de metila). Espectro de massas do componente 3 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do elaidato de metila (padrão).



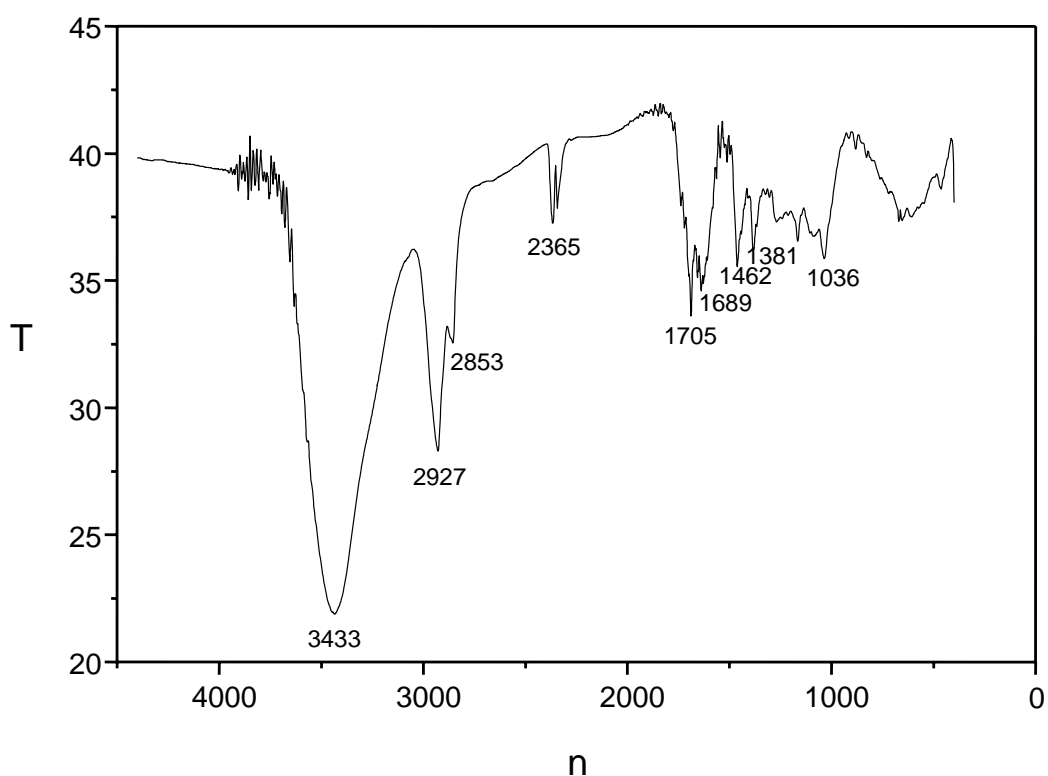
**Figura 3.5:** (*E*)-3,7,11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol (*trans*-fitol). Espectro de massas do componente 4 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do *trans*-fitol (padrão).



**Figura 3.6:** Octadecanoato de metila (estearato de metila). Espectro de massas do componente 5 identificado no extrato da fração diclorometano e espectro de massas do estearato de metila (padrão).

Ao comparar estes espectros com os relacionados pela literatura para esses compostos, foi possível verificar, as semelhanças entre os sinais correspondentes a cada fragmento iônico gerado a partir de cada íon molecular. Para todos os cinco compostos identificados, os picos base foram exatamente os mesmos mostrados pelos espectros “teóricos”, confirmando que se trata dos compostos identificados.

Aplicando a técnica da espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier na fração ativa de diclorometano da folha de *C. brasiliense*, foi possível verificar a existência dos principais grupos funcionais presentes nos compostos identificados por CG-EM (Fig.3.7). Este espectro foi comparado com os espectros de IVTF individuais de cada composto e observou-se boa concordância nas informações.



**Figura 3.7:** Espectro infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) do extrato da fração diclorometano. T: transmitância; n: número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Em  $3433 \text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda intensa e larga, correspondente às vibrações resultantes das ligações de hidrogênio intermoleculares em álcoois e ácidos carboxílicos. As bandas em  $2927 \text{ cm}^{-1}$  e  $2853 \text{ cm}^{-1}$  correspondem a deformações axiais de  $\text{CH}_2$  de cadeias longas saturadas. Em  $1705 \text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda que evidencia a presença do grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ). Em  $1462 \text{ cm}^{-1}$  observou-se

sinais correspondentes à deformação angular de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. Em 1036 cm<sup>-1</sup> observou-se uma banda correspondente à deformação angular fora do plano de OH de ácido. Estes resultados reforçaram a identificação dos compostos químicos presentes na fração diclorometano através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (Fig.3.7).

### 3.4- CONCLUSÕES

Através da CG-EM foi possível identificar os seguintes compostos presentes na fração DCM: palmitato de metila, ácido palmítico, elaidato de metila, álcool insaturado *trans*-fitol e estearato de metila.

Provavelmente, o palmitato de metila, composto químico presente em maior proporção na fração DCM, deve ter sido o principal responsável pelas alterações na germinação, crescimento, fisiologia e bioquímica de *B. pilosa* e *Z. mays*, com potencial alelopático satisfatório.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. Plantas de *Caryocar brasiliense* possuem na raiz, caule e folhas substâncias com propriedades aleloquímicas.
2. O EMF mostrou maior atividade alelopática. A fração DCM foi a mais ativa para todas as espécies estudadas
3. O EMF inibiu a germinação em *Bidens pilosa* e *Zea mays*, assim como a velocidade de germinação, o crescimento das plântulas e a produção de matéria seca total nessas espécies. *Glycine max* foi mais tolerante aos aleloquímicos presentes no EMF em relação à *B. pilosa* e *Z. mays*.
4. As trocas gasosas, os teores de pigmentos, a fluorescência da clorofila “a” e a taxa de transporte de elétrons foram inibidas significativamente pelo EMF em *B. pilosa* e *Z. mays*.
5. Os aleloquímicos presentes na fração DCM induziram ao estresse oxidativo em *B. pilosa* e *Z. mays*, ocasionando aumento na atividade de enzimas antioxidativas, como POX e SOD, extravasamento de eletrólitos e peroxidação lipídica. As variáveis analisadas em *G. max* não apresentaram diferenças significativas com a fração DCM.
6. Os compostos químicos identificados na fração DCM através de CG-EM e IVTF foram palmitato de metila, ácido palmítico, elaidato de metila, álcool insaturado *trans*-fitol e estearato de metila.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.S. 1990. Alelopatia: a defesa das plantas. *Ciência Hoje* 11(62):38-45.
- ALMEIDA, S.P. & SILVA, J.A. 1994. Piqui e buriti – importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: Embrapa – CPAC. 38p.
- ANAYA, A. L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:697-739.
- ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.; TORRES-BARRAGÁN, A. LÉON-CANTERO, R. & JIMÉNEZ-ESTRADA, M. 1996. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decopositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), matarique or maturing. *Journal of Chemistry Ecology* 22:393-403.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K. & STEWART, C.R. 1995. Changes in isozyme profile of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257.
- BARBOSA, L.C.de A.; MALTHA, C.R.A. & BORGES, E.E.L. 2002. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de lactonas derivadas do 2,4,-dimetil-8-oxabicyclo[3.2.1.]-oct-6-em-3-ona. *Química Nova* 25:203-208.
- BARKOSKY, R.R. & EINHELLIG, F.A. 1993. Effects of salicylic acid on plant-water relationships. *Journal of Chemical Ecology* 19:237-247.
- BARKOSKY, R.R., EINHELLIG, F.A. & BUTLER, J.L. 2000. Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurge *Euphorbia esula*. *Journal of Chemical Ecology* 26:2095-2109.
- BARKOSKY, R.R.; BUTLER, J.L. & EINHELLIG, F.A. 1999. Mechanisms of hydroquinone-induced growth reductions in leafy spurge. *Journal of Chemical Ecology* 25:1611-1621.
- BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; SAXENA, D.B. & KAUR, S.2002. Allelopathy effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. *Environmental and Experimental Botany* 47:149-155.
- BAZIRAMAKENGA, R. LEROUX, G.D. & SIMARD, R.R. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology* 21:1271-1285.
- BEAUCHAMP, C.O. & FRIDOVICH, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287

- CAKMAK, I.; STRBAC, D.& MARSCHNER, H. 1993. Activities of hydrogen peroxide – scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* 44(258):127-132.
- CASTAÑEDA, P.; MATA, R.; LOTINA-HENNSEN, B.; ANAYA, A.L. & BYE, R. 1996. Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *Journal Natural Products* 59:232-326.
- CHANCE, B. & MAEHLEY, A.C. 1955 Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775
- CHON, S.U; CHOI, S.K; JUNG, S. JANG, H.G; PYO, B.S & KIM, S.M. 2002. Effects of alfafa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. *Crop Protection* 21:1077-1082.
- CHOU, C. H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:609-636.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. 1997. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da Unicamp. Campinas, São Paulo. 279p.
- CORREIA, N.M.; CENTURION, M.A.C. & ALVES, P.L.C.A. 2005. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. *Ciência Rural* 35(3):498-503.
- DEL LONGO, O.T.; GONZALES, C.A.; PASTORI, G.M. & TRIPPI, V.S. 1993. Antioxidant defenses under hypergenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology* 34: 1023-1028.
- DELACHIAVE, M.E.A.; RODRIGUES, J.D. & ONO, E.O. 1999. Efeitos alelopáticos de losna (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. *Revista Brasileira de Sementes* 21(2):265-269.
- DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. 1991. **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic Press. V6, 342p.
- DUKE, S.O. & ABBAS, H. 1995. Natural products with potencial use as herbicides. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M; EINHELLIG, F.A. (ed). **Allelopathy: organisms, processes and application**. Washington: American Chemical Society, p.349-362.

- DUKE, S.O.; DAYAN, F. & RIMANDO, A. 1998. Natural products as tools for weed management. Recent topics of weed science and weed technology. JA hall, Tokyo. p1-11.
- EINHELLIG, F.A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTMAN, A.R. & TANG, C.S. (ed). **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons. p.171-188.
- EINHELLIG, F.A. 1995. Allelopathy: current status and future goals. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M; EINHELLIG, F.A. (ed). **Allelopathy: organisms, processes and application**. Washington: American Chemical Society, p.1-24.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I. & SIMÕES, C.M.O. 2001. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. (Org.). 2001. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC. Porto Alegre, RS. p.165-182.
- FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de fisiologia Vegetal 12 (edição especial):175-204.
- FERREIRA, M.L. 1998. **Síntese e avaliação da atividade herbicida de quinonas**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 151p.
- FERRI, M.V.W.; FOLETTO, F.L. & LOPES, S.J. 2001. Aplicação de herbicidas dessecantes em pastagens nativas constituídas por diferentes espécies do gênero *Paspalum*. Ciência Rural 31(4):589-595.
- FRIEBE, A., ROTH, U., KÜCK, P. SCHNABI, H. & SCHULZ, M. 1997. Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Phytochemistry 44:979-983.
- GALINDO, J.C.G.; HERNÁNDEZ, A.; DAYAN, F.E.; TELLEZ, M.R.; MACÍAS, F.A.; PAUL, R.N. & DUKE, S.O. 1999. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. Phytochemistry 52:805-813.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.; & LIMA, M.I.S. 2004 Atividade de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L e *Raphanus sativus* L. ACTa Botânica Brasília 18(3):459-472.
- GIANNOPOLITIS, C.N. & RIES, S.K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

- GONZALES, V.M.; KAZIMIR, J.; NIMBAL, C.I.; WESTON, L.A. & CHEINAE, G.M. 1997. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *Journal of Agricultural Food Chemical* 45:1415-1355.
- GONZÁLEZ-BERNARDO, E., AGUILAR, M.I., DELGADO, G., KING-DIAZ, B. & LOTINA-HENNSSEN, B. 2003. Photosynthetic electron transport interaction of xanthorrhizol isolated from *Iostephane heterophylla* and its derivatives. *Physiologia Plantarum* 119:598-604.
- HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C. & LONG, S.P. 1993. **Photosynthesis and production in a changing environmet – a field and laboratory manual**. Chapman & Hall, London. 478p.
- HEATH, R.L. & PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated cloroplast. I. Kinetics and stoichometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- HEJL, A.M., EINHELLIG, F.A. & RASMUSSEN, J.A. 1993. Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. *Journal of Chemical Ecology* 19:559-567.
- HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. & BROWN, S.B. 1987. The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytology* 107(2):255-302.
- INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review* 61:28-44.
- INDERJIT & WESTON, L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses. *Journal of Chemical Ecology* 26:2111-2118.
- INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M. & EINHELLIG, F.A. 1995. **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. ACS Symposium Series582, Washington, DC.
- INDERJIT. 1996. Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review* 62:186-201.
- JAIN, A. & SRIVASTAVA, H.S. 1981. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiology Plantarum* 51:339-342.
- JOSE, S. & GILLESPIE, A.R. 1998. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays*

- L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. *Plant and Soil* 203:199-205.
- KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNÁNDEZ-TERRONES, M. & LOTINA-HENNSSEN, B. 2001. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. In: BERNAL-LUGO, I. & LOZA-TAVERA, H. (Ed.) 2001. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**. Ciudad de México. p111-132.
- KOBAISY, M.; TELLEZ, M.R.; WEBBER, C.L.; DAYAN, F.E.; SCHRADER, K.K. & WEDGE, D.E. 2001. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 49:3768-3771.
- KRAUSE, H. & WEIS, E. 1988. Applications of chlorophyll fluorescence. LICHTENTHALER, H.K (ed). Klumer Academic Publishers, Dordrecht.
- LABOURIAU, L. G. & VALADARES, M. B. 1976. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, São Paulo, 48:174-186.
- LARCHER, W. 2004. **Ecofisiologia vegetal**. RiMa Artes e Textos, São Carlos, 531p.
- LOTINA-HENNSSEN, B.; BERNAL-MORALES, E. ROMO DE VIVAR, A.; PEREZ, A.L ; CASTRO, A. & AGUILAR, M. 1992. Inhibition of oxygen evolution by zaluzanin C. *Chemical Journal of Ecology* 18:1891-1900.
- MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., CASTELLANO, D. & VELSACO, R.F. 1999. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicide models (I): *trans*, *trans*-germacranolides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4407-4414.
- MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., CASTELLANO, D. & VELSACO, R.F. 2000. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicide models. 2.Guaianolides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5288-5296.
- MACÍAS, F.A., SIMONET, A.M., PACHECO, P.C., BARRERO, A.F., CABRERA, E. & JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, D. 2000b. Natural and synthetic podolactones with potencial use as natural herbicide models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3003-3007.
- MAGUIRE, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, 2(2):176-177.

- MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, N.E. & NEGRÃO, I.O. 2002. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciência Agrotécnica Edição Especial*:1410-1419.
- MELLO, J.C.P. & SANTOS, S.C. 2001. Taninos. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. (Org.). 2001. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC. Porto Alegre. p.527-554.
- MIZUTANI, J. 1999. Selected allelochemicals. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:653-671.
- MOREIRA, P.F.S.D. 2005. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi). Dissertação de mestrado. UFU. 80p.
- MOTTER, M.D.S.; SILVA, L.D.; OLIVEIRA, R.B.; YAMADA, A.T.; SANTOS, S.C. & SABÓIA-MORAIS, S.M.T. 2004. Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de pequi (*Caryocar brasiliensis*) *Brazilian Journal of Veterinary research and Animal Science* 41:221-227.
- OLIVEIRA, M.M.; SAMPAIO, R.P.; GIORGI, W. GILBERT, B. & MORS, W.B. 1970. *Caryocar brasiliense* – isolamento e identificação de algumas substâncias com atividade biológica sobre o sarcoma 180. *Arquivos do Instituto Biológico* 37:25-27.
- OLIVEIRA, M.M; GILBERT, B. & MORS, W.B. 1968. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 40:451-452.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G; BORGHETTI, F. 2004. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A.St. Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *ACTa Botânica Brasília*, 18(3):401-406.
- PANDEY, D.K.; MISHRA, N. & SINGH, P. 2005. Relative phytotoxicity of hydroquinone on rice (*Oryza sativa* L.) and associated aquatic weed green musk chara (*Chara zeylanica* Willd) *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83:82-96.
- PASSOS, X.S.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, T.F.; GARCIA, A.C.F. & SILVA, M.R.R. 2002. Atividade antifúngica de *Caryocar*

- brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35(6):623-627.
- PATTERSON, D.T. 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). Weed Science 29(1):53-59.
- PAULETTI, P.M.; BOLZANI, V.S. & YOUNG, M.C.M. 2003. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). Química Nova 26(5):641-643.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R. & MOREIRA, M.A. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 11: 137-143.
- PERES, M.T.L.P.; PIZZOLATTI, M.G.; QUEIROZ, M.H. & YUNES, R.A. 1998. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (Pr.). Pesquisa Agropecuária Brasileira 33:131-137.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta Botanica Brasílica, 18(3):425-430.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. & LOPES, B.M. 2001. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. Floresta e Ambiente 8(1):130-136.
- PINHEIRO, M.L.B.; ROCHA, A.F.I.; FERNANDES, M.A.N.; MONTE, F.J.Q.; VILLARE, J.D.F. & CRUZ, E.R. 2004. Lignanais de *Strycnos guianensis* (Aublet) Mart. Química Nova, 27(2):188-192.
- PIRES, N.M. & OLIVEIRA, V.R. 2001. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR., R.S. & CONSTANTIN, J. (Ed). 2001. **Plantas daninhas e seu manejo**. Editora Agropecuária. Guaíba, RS. p.145-185.
- PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA FILHO, I.A.; OLIVEIRA JR, R. S. & FARIA, T.C.L. 2001. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. Scientia Agricola, 58 (1):61-65.
- PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A. & MAGALHÃES, P.C. 2000. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 35(5):909-914.
- RICE, E.L. 1984. **Allelopathy**. Academic Press, Orlando, Flórida.

- RIFFLE, M; WALLER, G.R.; MURRY, D.S. & SGARAMELLO, R.P. 1991. Composition of essential oil from *Proboscidea louisianica* (Martyniaceae). Academic Science 71:35-42.
- RIZVI, S.G.H. & RIZVI, V. (Eds.) 1992. **Allelopathy: basic and applied aspects**. Chapman and Hall, London.
- RIZVI, S.J.H., TAHIR, M., KOHLI, R.K. & ANSARI, A. 1999. Allelopathic interactions in agroforestry systems. Critical Reviews in Plant Sciences 18:773-796.
- RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D. & BALBINOT JR., A.A. 2003. Previsão da perda de rendimento de grãos de soja causada pela infestação de plantas daninhas utilizando variáveis foliares relativas. Planta Daninha 21:45-54.
- SCANDALIOS, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101:7-12.
- SIEGEL, B.Z. 1993. Plant peroxidase – an organismic perspective. Plant Growth Regulation 12:303-312.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K.; SAXENA, D.B. & ARORA, V. 2002. Effect of parthenin - a sesquiterpene lactone from *Parthenium hysterophorus* - on early growth and physiology of *Ageratum conyzoides*. Journal of Chemical Ecology 28(11):2169-2179.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR, N.G.; HAMMERCHIDT, R & SAFIR, G.R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. Critical Review in Plant Science 10:63-121.
- SOUZA FILHO, A.P.S. 2002. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Planta Daninha, 20(3):357-364.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G. & BAYMA, J.C. 2005. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. Planta Daninha 23(1):25-32.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2002. **Plant Physiology**. 3<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. 690p.
- TARHANEN, S., METSÄRINNE, S., HOLOPAINEN, T. & OKSANEN, J. 1999. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. Environmental Pollution 104: 121-129.

- TURNER, N.C. 1972. Stomatal behavior of *Avena sativa* treated with two phytotoxins, victorin and fusaric acid. *American Journal of Botany* 59(2):133-136.
- TURNER, N.C. 1973. Action of fusaric acid on the potassium balance of guard cells of *Phaseolus vulgaris*. *American Journal of Botany* 60(7):717-725.
- VISCHETTI, C. & ESPOSITO, A. 1999. Degradation and transformation of potential natural herbicide in three soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:3901-3904.
- VYVYAN, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58:1631-1646.
- WALLER, G.R.; FEUG, M.C & FUJII, Y. 1999. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M & FOY, C.L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press. p.75-98.
- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.
- WERKER, E. PUTIEVSKY, E. RAVID, U. DUDAI, N. & KATZIR, I. 1993. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annals of Botany* 71:43-50.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D. & AN, M. 2000. Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology* 26(9): 2141-2154.
- YU, J.Q.; YE, S.F.; ZHANG, M.F. & HU, W.H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:129-139.