

GABRIELA BRITTO DA SILVEIRA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO DE AROEIRA
(*Myracrodruonurundeuva*Allemão)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S587i
2015 Silveira, Gabriela Britto da, 1986-
Investigação do potencial fitotóxico de aroeira (
Myracrodruon urundeuva Allemão) / Gabriela Britto da Silveira.
– Viçosa, MG, 2015.
ix, 62f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.54-58.

1. Química vegetal. 2. Aroeira-do-Sertão - Toxicologia. 3.
Myracrodruon urundeuva. 4. Aleloquímicos. 5. Alelopatia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 572

GABRIELA BRITTO DA SILVEIRA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO DE AROEIRA
(*Myracrodruonurundeuva*Allemão)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2015.

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)(Coorientador)

Elpídio Inácio Fernandes Filho

AntonioLelis Pinheiro

Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

“Dedico aos meus pais, Sandra e Marcelo,
e ao meu companheiro, Renato”

“A felicidade é sempre um resultado da atividade criativa”

Dalai-Lama

iii

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional vivida ao longo desses últimos dois anos.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Marcelo e Sandra, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos. Aos irmãos Guilherme, Gabriel e Julia pela amizade e alegria de compartilhar.

Ao Renato, meu querido companheiro, agradeço pela vontade de estar ao meu lado, pela paciência, pelo zelo, pelo carinho e por toda a ajuda para a concretização dessa missão.

Aos queridos amigos da Luz do Firmamento pelos anos de acolhimento, amizade, aprendizados e crescimento e pela comunhão dentro da nossa Santa Doutrina. Em especial a Cacá, Felipe, Tati e Pedro pela ajuda na logística, conselhos e amizade.

À Sarah, Miguel e cia, por serem uma família para mim, pela grande amizade que temos, pelos conselhos, pelo apoio, por estarem sempre ao meu lado, até nas horas mais difíceis, sempre me trazendo equilíbrio, alegria e conforto.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner, pela orientação, paciência e confiança.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pelo exemplo e pela contribuição crucial na compreensão do trabalho e do fazer científico como um todo.

Ao professor Elpídio pela oportunidade de participar deste projeto. Ao Felipe Pinho, por toda a colaboração e disponibilidade.

Aos amigos Dayana e Gustavo, pela colaboração e conselhos.

À Jodieh Oliveira Santana Varejão, pela contribuição e leitura criteriosa de meu trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Química, Cristiane, Márcio e em especial ao José Luis, pela aquisição dos espectros e ajuda na purificação por CLAE.

A todos os colegas do LASA pelo convívio e pelas contribuições.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela oportunidade.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. GENERALIDADES METODOLÓGICAS	12
2.1.1. Métodos cromatográficos	12
2.1.2. Espectroscopia no Ultravioleta (UV)	13
2.1.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV)	13
2.1.4. Espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (EM-EI)	13
2.1.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)	14
2.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	14
2.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	14
2.4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i>	15
2.4.1. Filtração gradiente em funil de placa sinterizada (coluna filtrante)	15
2.4.2. Cromatografia em coluna por exclusão	15
2.4.3. Fracionamento da fração S2.7 por CLAE-UV	16
2.4.3.1. Purificação da fração F3 por CLAE-UV	17
2.4.4. Derivatização da fração S2.8 e análise por CG-MS	18
2.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	18
2.5.1. Teste de germinação com o extrato bruto	18
2.5.2. Teste de germinação com as frações da coluna filtrante	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	22
3.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA DO EXTRATO BRUTO	23
3.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO EM GRADIENTE DE POLARIDADES	26
3.4. ATIVIDADE FITOTÓXICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DA COLUNA FILTRANTE	28
3.4.1. Pepino	29
3.4.2. Sorgo	33
3.4.3. Cebola	36
3.4.4. Avaliação geral do ensaio	40
3.6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO MEOH	41

3.7. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO S2.7 POR CLAE	44
3.7.1. Estudo da fase móvel para purificação da fração S2.7	45
3.7.2. Isolamento do composto T8 por CLAE semi-preparativa	45
3.7.3. Elucidação estrutural do composto T8	47
3.8. Caracterização da fração S2.8 por CG-MS	50
4. CONCLUSÕES	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICES	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
ATR	Reflectância total atenuada
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector com arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
HEX	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
CD ₃ OD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
m/z	Razão massa carga
MHz	Megahertz
nm	Nanômetros
ppm	Partes por milhão
R _F	Fator de retenção
t _R	Tempo de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
δ	Deslocamento químico
s	Simpleto
UV	Ultravioleta

RESUMO

SILVEIRA, Gabriela Britto da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Investigação do potencial fitotóxico de Aroeira (*Myracrodruonurundeuva* Allemão).** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Elpídio Inácio Fernandes Filho.

Algumas plantas se utilizam de estratégias químicas de dominação do ambiente, através da biossíntese de aleloquímicos. Quando liberados no ecossistema, tais compostos exercem influência sobre o desenvolvimento de outras plantas, fenômeno conhecido como alelopatia. O uso de solventes orgânicos e tecnologias de extração permite uma caracterização preliminar da composição da planta, assim como o estudo de sua fitotoxicidade. Na família Anacardiaceae, pelo menos 25% dos gêneros apresentam propriedades tóxicas, muitas delas relacionadas à ação de compostos fenólicos. O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo do potencial fitotóxico de folhas de *Myracrodruonurundeuva* (Aroeira), que apresenta situação de dominância na região de Aimorés-MG. As folhas moídas foram maceradas com etanol a frio por sete dias. O extrato foi concentrado e fracionado em coluna filtrante com hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol/água (1:1) e água. O extrato bruto e as frações foram utilizados em ensaios de germinação de sementes, apresentando alto potencial na inibição do desenvolvimento das mesmas. Nos tratamentos com o extrato bruto, o crescimento de radículas sofreu maior inibição do que o de hipocótilos, sendo que a 50 ppm foi observada inibição de 82% no crescimento de radículas de sorgo. Para os ensaios com as frações, foram observadas maiores inibições nos tratamentos com as frações mais polares. O tratamento com o extrato MeOH provocou inibição no desenvolvimento de todas as sementes, chegando a inibir em 63% o desenvolvimento de hipocótilos de cebola na concentração de 1000 ppm. Por apresentar melhor resultado fitotóxico, a fração metanólica foi submetida a purificação por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) possibilitando a caracterização de ácido gálico e galato de metila, compostos fenólicos amplamente conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas. Assim, os resultados dos ensaios químicos e biológicos sugerem que as folhas de aroeira podem ser responsáveis pela produção de aleloquímicos em possíveis interações alelopáticas no seu ambiente natural.

ABSTRACT

SILVEIRA, Gabriela Britto da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Investigation on the Aroeira (*Myracrodruonurundeuva* Allemão) phytotoxic potential.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Elpídio Inácio Fernandes Filho.

Some plants utilize chemical strategies for dominating environmental conditions through the biosynthesis of allelochemicals. These compounds, liberated in ecosystems, cause influences over the development of surrounding plants in a phenomenon called allelopathy. The utilization of organic solvents and extraction technologies allow the preliminary characterization of plant composition, moreover, the investigation of plant's phytotoxicity. In Anacardiaceae family, at least, 25% of genres have toxic properties, in most cases related to phenolic compounds action. The main objective of this work was study the phytotoxic potential of *Myracrodruonurundeuva* (Aroeira) leafs, that shows a pattern of dominance of vegetal communities in Aimorés-MG. The powdered leafs were macerated in ethanol for seven days. The extract was concentrated and submitted to gradient fractionation with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, methanol/water (1:1) and water. For crude extract and its fractions, were utilized bioassays for seed germination and growth seedlings. The results suggest high inhibitory potential for growth seedlings. In crude extract replicates, radicle growth suffered more inhibition compared to hypocotyls, at 50 ppm the inhibition was 82% for sorghum radicle growth. The assays with fractions showed rises in inhibition at replicates with higher polarity. The MeOH extract provided inhibition for all tested species. For the hypocotyls growth in onions the inhibition presented a value of 63% in the concentration of 1000 ppm. The methanolic fraction presented higher phytotoxicity, therefore it was purified in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) allowing the characterization of gallic acid and methyl galate, two phenolic compounds widely known by its biologic activity. The results of chemical and biological assays suggest that leafs of aroeira are probably responsible for allelochemicals production and the interaction of this substances in natural environment can result in allelopathy.

1.

INTRODUÇÃO

Os produtos do metabolismo secundário dos vegetais são objetos de estudo da Química de Produtos Naturais e incluem uma vasta gama de compostos que apresentam papel fundamental nas estratégias de sobrevivência das plantas (HARTMANN, 2007). Levando-se em conta que a biossíntese de tais compostos ocorre nos tecidos vegetais deve ser enfatizada a influência de fatores ambientais como clima, tipo de solo, sazonalidade, oferta hídrica, dentre outros, nos teores de metabólitos secundários. Assim, sob condições distintas, uma mesma planta pode apresentar diferentes conteúdos de compostos bioativos (GLOBBONETTO & LOPES, 2007).

Tendo em consideração que uma planta contém milhares de constituintes, o isolamento de substâncias muitas vezes é feito em várias etapas e combinando diversas técnicas de separação, dependendo da solubilidade, volatilidade e estabilidade dos compostos a serem separados (STICHER, 2007). Técnicas de derivatização podem ser empregadas, principalmente em casos de compostos de alta massa molar e/ou grupos funcionais fortemente polares. Nas reações de derivatização, determinados grupos moleculares são associados aos compostos de interesse, agregando características desejáveis à análise e caracterização dos mesmos (BONATO, 2006).

Os diversos métodos de extração são utilizados como etapas de pré-purificação para remover interferentes seletivamente. A extração inicial do material vegetal com solventes de baixa polaridade agrega uma maior quantidade de componentes lipofílicos, enquanto solventes mais polares como o etanol permitem a obtenção de materiais num largo espectro de polaridades (STICHER, 2007). Subsequentes partições com diferentes solventes permitem a obtenção de frações numa escala mais refinada de polaridades. Isto pode ser feito utilizando, por exemplo, suportes cromatográficos como sílica gel (em fase normal ou reversa) e eluindo o sistema com solventes em ordem crescente de polaridades (FILHO & YUNES, 1998).

Na busca por substâncias bioativas, o ideal é que a cada etapa do fracionamento sejam feitos testes biológicos, de modo que as frações que apresentem as atividades de interesse sejam submetidas aos procedimentos cromatográficos, visando o isolamento e elucidação estrutural dos princípios ativos

(ELOFF, 2004). Essa técnica é conhecida como fracionamento bioguiado (RATES, 2001).

As etapas subsequentes de isolamento de produtos naturais em geral envolvem técnicas de cromatografia em coluna clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dentre outras (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A verificação da composição das frações e a caracterização dos compostos isolados são feitas por meio de técnicas espectroscópicas como UV, IV, RMN e por espectrometria de massas (RATES, 2001)

De maneira geral, o esquema da Figura 1 ilustra os procedimentos utilizados na busca por compostos bioativos.

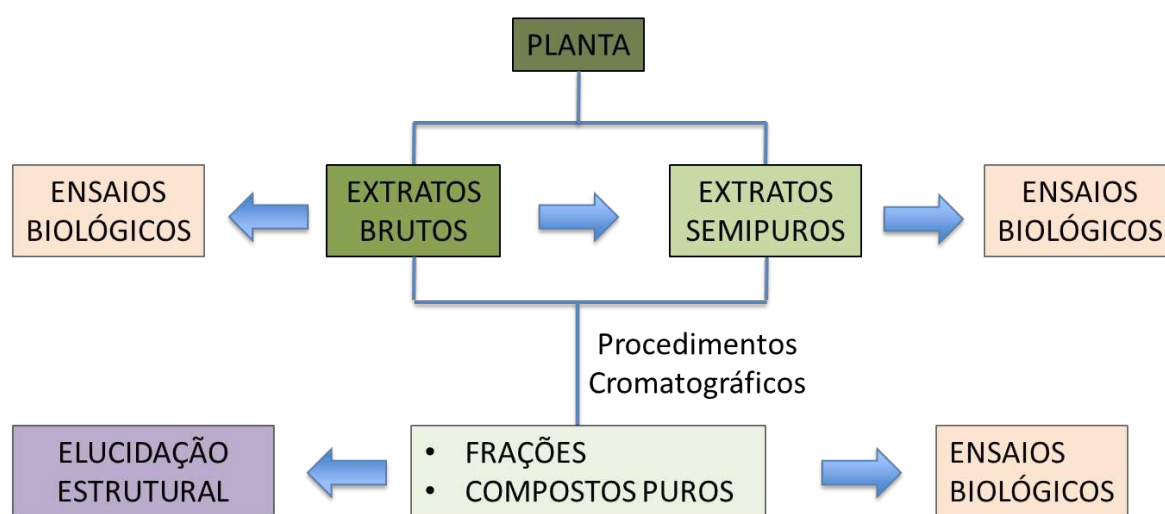


Figura 1: Procedimentos gerais para a obtenção de compostos bioativos de plantas

O isolamento de morfina a partir da papoula (*Papaversoniferum*), há aproximadamente 200 anos, é considerado o marco do início da química de produtos naturais, sendo a primeira demonstração de que o princípio ativo de uma planta poderia ser isolado e atribuído a um único composto químico (HARTMANN, 2007).

Desde então a área apresentou um rápido desenvolvimento e outros compostos com atividades biológicas foram estudados. Com mais de 200.000 estruturas definidas, ainda hoje há muito o que se conhecer (HARTMANN, 2007). Para se ter uma ideia, apenas cerca de 1% das espécies tropicais já tiveram seu potencial farmacêutico estudado (GURIB-FAKIM, 2006).

Atualmente, muito mais já é sabido sobre o modo de ação dos compostos bioativos. As plantas tipicamente contém misturas de diferentes compostos que podem agir individualmente, aditivamente ou em sinergia para potencializar, inibir ou

até mesmo viabilizar a atividade biológica. Isso quer dizer que os efeitos de um composto podem ser aumentados, reduzidos ou até mesmo transformados pela interação com outras substâncias (EINHELLIG, 1999).

Os estudos dos produtos naturais norteiam-se nas ciências etnobotânicas e etnofarmacológicas, que são adotadas como guias na prospecção de diferentes fontes e classes de compostos bioativos (GURIB-FAKIM, 2006). Nesse sentido, países de flora tropical com elevada biodiversidade como o Brasil apresentam enorme potencial para o conhecimento de novas moléculas. Apesar de ser um desafio, conhecer os produtos do metabolismo da flora nativa é antes de tudo uma oportunidade de conhecer para conservar a natureza e para o aproveitamento consciente dos recursos naturais (CBD, 2010). Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo. Além disso, a maioria da população mundial se utiliza do conhecimento tradicional das plantas, passado através das gerações, para suprir suas necessidades do dia-a-dia (BEGOSSI et al., 2002).

Em seguida são apresentadas algumas das mais notáveis classes de compostos em termos de atividades biológicas (GURIB-FAKIM, 2006):

Glicosídeos cianogênicos

Glicosídeos cianogênicos são compostos derivados de aminoácidos, cuja hidrólise ácida produz ácido cianídrico (o princípio tóxico). Tais compostos são predominantes em família como Rosaceae, Leguminosae, Graminae, Araceae, Euphorbiaceae e Passifloraceae. Um exemplo de glicosídeo cianogênico é a linamarina (Figura 2).

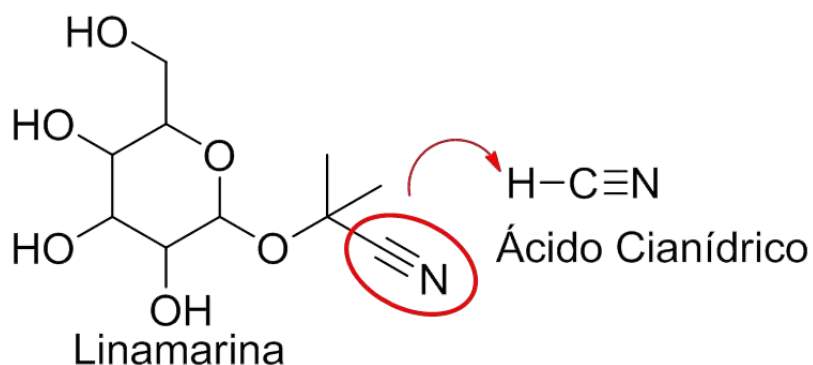


Figura 2: Estrutura da Linamarina com destaque para o sítio onde ocorre a hidrólise e formação de ácido cianídrico

Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de se ligar reversivelmente à partes lipofílicas de membranas celulares. Algumas apresentam habilidade de aglutinar glóbulos vermelhos de determinados grupos sanguíneos. Um exemplo de lectinatóxica é a Ricina, encontrada no óleo de Mamona (*Ricinus communis* L.).

Alcalóides

O termo alcalóide tem sido usado para definir compostos orgânicos cíclicos alcalinos contendo nitrogênio alcalino. Podem ser alcalóides heterocíclicos ou não heterocíclicos e normalmente são limitados às plantas superiores. Um exemplo de alcalóide não heterocíclico é a mescalina (Figura 3), obtido a partir do cacto peiote (*Lophophora williamsii*).

Figura 3: Estrutura da mescalina

Algumas das famílias conhecidas por apresentarem essa classe de compostos são: *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Apocynaceae*, *Berberidaceae*, *Leguminosae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae* e *Solanaceae*.

Terpenos e terpenóides

Terpenos e terpenóides são derivados do isopreno. Estes compostos são classificados como hemi, mono, sesqui, di e triterpenos contendo, respectivamente, cinco, dez, quinze, vinte e trinta carbonos, e assim por diante. Quando possuem oxigênio em sua estrutura, são denominados terpenóides. Um exemplo de composto desse tipo é a Santonina (Figura 4), amplamente distribuída na natureza e em

especial na família *Asteraceae*, que apresenta alto potencial fitotóxico (ALVARENGA et al., 2009).

Figura 4: Estrutura da Santonina

Flavonóides

Os flavonóides são os principais responsáveis pelas cores de flores, frutas e algumas folhas, atuando na proteção das plantas contra os danos causados pela radiação UV e na atração de animais polinizadores. As estruturas básicas dos flavonóides são apresentadas na Figura 5. Diversas atividades têm sido atribuídas a flavonóides, dentre as quais se destacam as atividades antioxidante, vasodilatadora e imunoestimulante.

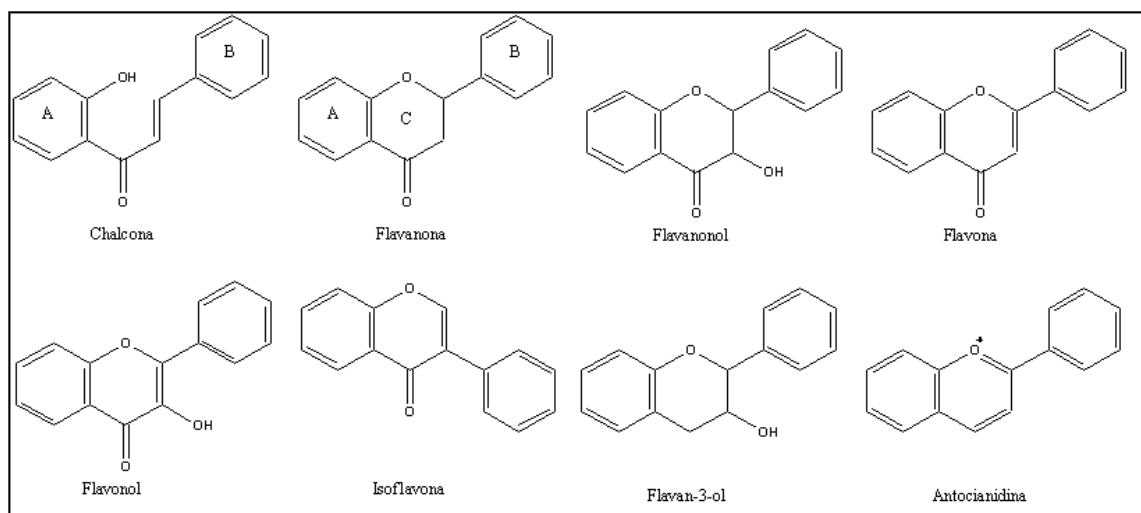


Figura 5: Esqueletos básicos de Flavonóides

Compostos fenólicos e seus glicosídeos

Constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários. Podem ser divididos em compostos fenólicos simples, compreendendo compostos contendo

anel aromático monocíclico ligado a grupos hidroxila, carbonila ou carboxila, ou em taninos.

Dotados de uma química complexa, os taninos se dividem em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (proantocianidinas). De maneira geral, os compostos conhecidos como galotaninos e elagitaninos, que são os ésteres do ácido gálico e elágico (Figura 6) muitas vezes ligados a grupos glicosídicos, representam o grupo dos taninos hidrolisáveis. Já o grupo das proantocianidinas é constituído por oligômeros de flavan-3-ol (catequinas) e 3,4-flavandiol (leucoantocianidinas).

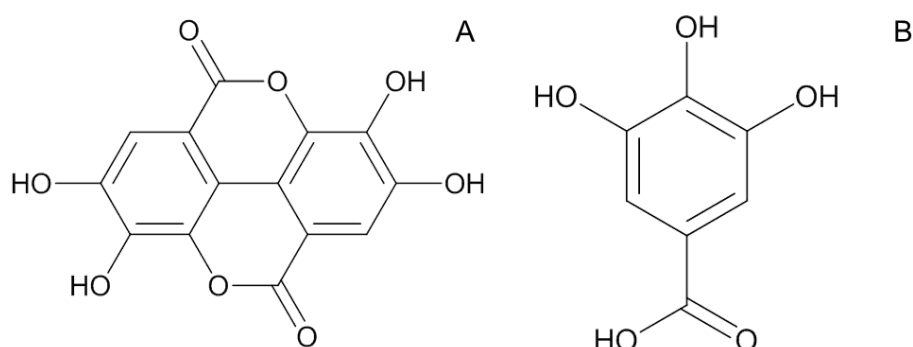


Figura 6: Estrutura dos ácidos gálico (A) e elágico (B)

Taninos são conhecidos por sua capacidade de reagir com proteínas, como por exemplo no processo conhecido como tanagem de peles, onde o tanino é absorvido, protegendo a pele contra a putrefação e transformando-a em couro.

Uma propriedade que chama muita atenção para o estudo de compostos fenólicos é o seu grande potencial alelopático (INDERJIT, 1996). Ferreira (2004) define a alelopatia como as influências exercidas pelos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, que quando liberados no ambiente interferem no crescimento de outras plantas. Nesse contexto, o termo aleloquímicos designa os compostos envolvidos em interações alelopáticas.

Na natureza, a alelopatia pode ser observada, por exemplo, na rotação de culturas agrícolas, onde muitas vezes os restos (ou resteva) das culturas passadas retardam o crescimento das novas culturas. A liberação dessas substâncias no ambiente ocorre principalmente através de lixiviados de folhas, compostos voláteis, serapilheira, decomposição da matéria orgânica da planta no solo ou exudatos de raízes (FERREIRA, AQUILA, 2000).

A distinção entre alelopatia e fitotoxicidade consiste, principalmente, nas

diferenças entre os procedimentos de extração dos compostos bioativos. Apesar da complexidade de um ambiente natural nem sempre permitir uma fiel reprodução do mesmo, estudos de alelopatia devem se aproximar ao máximo das condições naturais, como por exemplo, o modo pelo qual as substâncias são liberadas no ambiente. O uso de solventes orgânicos e tecnologias de extração caracteriza estudos de fitotoxicidade, uma vez que na natureza o solvente extrator predominante é a água e a otimização do processo só pode ocorrer pelo meio das variações naturais de condições como clima, oferta hídrica, etc (REIGOSA et al., 2013).

Outro aporte que caracteriza estudos de fitotoxicidade e não de alelopatia é o uso de espécies-alvo que não coexistem no ambiente natural da espécie que apresenta potencial alelopático. Contudo, tais estudos são importantes ferramentas, considerados estudos preliminares do potencial alelopático de plantas (INDERJIT, 1996).

Alguns exemplos de compostos responsáveis por reais interações alelopáticas no campo são: sorgoleona (produzido pelo sorgo) e seus derivados (BARBOSA et al., 2001), juglona (produzido por *Juglans* spp.), avenacina (produzido por *Avenafatua*) e cumarinas (produzidas por *Arctostaphylos* spp.) (REIGOSA et al., 2013).

Os mecanismos pelos quais os aleloquímicos agem podem ser diversos e a ação pode ser direta ou indiretamente direcionada às plantas-alvo. De maneira indireta, os aleloquímicos podem atuar limitando um recurso essencial ao desenvolvimento da espécie-alvo. Por outro lado, ações diretas são observadas, como por exemplo, influência sobre o ciclo celular de meristemas das raízes, produção de espécies oxidantes que interferem no ciclo celular, alteração da permeabilidade das membranas, interferências no balanço hídrico e regulação osmótica (GNIAZDOWSKA, BOGATEK, 2005).

Constituintes fenólicos são amplamente encontrados em espécies da família Anacardiaceae. Representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies, tem se mostrado uma fonte promissora de compostos bioativos (CERUKS, et al., 2007). A diversidade de metabólitos e atividades biológicas tem justificado o enorme interesse no estudo de espécies desta família. Pelo menos 25% dos gêneros apresentam propriedades tóxicas, muitas delas relacionadas à ação de compostos fenólicos (CORREIA et al., 2006). Barbosa et al. (2007) observaram alto potencial de inibição dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Schinusterebintifolius* sobre o desenvolvimento de sementes de alface e pepino.

Nesse âmbito, especial atenção é dada à espécie *Myracrodruon urundeuva* Allemão, popularmente conhecida por diversos nomes como aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-preta, dentre outros. A árvore pode atingir entre 5-15 m de altura e 15-60 cm de diâmetro no cerrado e na caatinga, enquanto nas florestas tropicais são encontrados indivíduos com até 30 m de altura e 100 cm de diâmetro. A aroeira é caducifolia e sua florada só ocorre após a perdatotal das folhas. O período de florada pode variar de acordo com a região, mas nas regiões central e sudeste do Brasil costuma ocorrer entre julho e agosto (LEITE, 2002).

No Brasil, *M. urundeuva* encontra-se amplamente distribuída na região nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Bahia e Pará, na transição entre a floresta amazônica, o cerrado e a caatinga, assim como também pode ser encontrada no sudeste e região central do Brasil, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins e Goiás (LEITE, 2002).

Estudos fitoquímicos preliminares foram realizados por De Bessa et al. (2013) através de testes qualitativos com o extrato etanólico de folhas de aroeira, na perspectiva de identificar os grupos de metabólitos secundários presentes no mesmo. Diferentes testes foram empregados e resultados positivos foram obtidos para a presença de saponinas, catequinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, alcaloides e, principalmente fenóis e taninos no extrato foliar de *M. urundeuva*.

Queiroz et al. (2002) produziram extratos a partir da madeira da aroeira que apresentaram teores de compostos fenólicos totais entre 37 e 56 mg g⁻¹ de madeira seca. Os taninos condensados ou proantocianidinas também foram quantificados apresentando um teor de 31,2 mg g⁻¹. Os principais componentes identificados foram a fisetina e os ácidos gálico e elágico, além de flavanonas, flavanóis e elagitaninos em menor quantidade. Do extrato etanólico do cerne da madeira, Bandeira et al. (2004) isolaram quatro chalconas dímeras conhecidas como urundeuvinas A,B e C e maltosina (Figura 7).

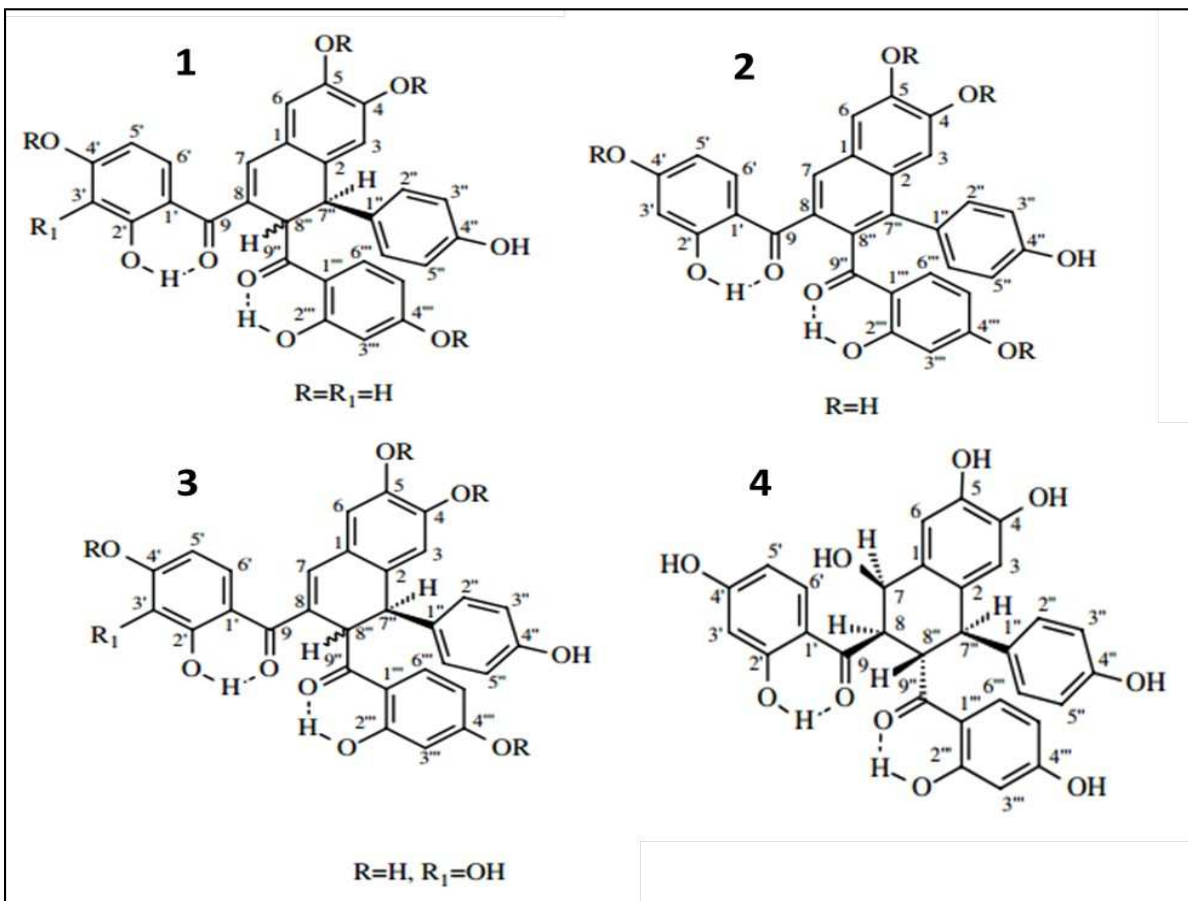


Figura 7:Urundeuvinas A (1), B (2) e C (3) e maltosina (4). Adaptado de Bandeira et al. (2004)

Viana et al. (1997) obtiveram duas frações do extrato obtido da casca da aroeira que apresentaram atividade anti-inflamatória. Através de testes químicos, foi confirmado que uma dessas frações era composta principalmente por taninos condensados e a outra fração apresentava predominantemente compostos do tipo chalconas. Dessa última, também foram isoladas as urundeuvinas A, B e C (Viana et al., 2003).

O extrato metanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* apresentou em sua composição taninos, flavonoides e derivados do ácido gálico e de galotaninos (Machado, 2013), sendo que os últimos são classes de metabólitos promissoras do ponto de vista farmacológico, devido à ampla variedade de atividades biológicas apresentada pelos mesmos e ao fato de estarem presentes em grande número de espécies vegetais (de Bessa et al., 2013).

Souza (2012) obteve o extrato etanólico de folhas de *M. urundeuva* e identificou as substâncias ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido protocatecuico, ácido clorogênico e ácido elágico por CLAE através da coinjeção com os padrões. Pelo fracionamento fitoquímico foram isolados os

galotaninos, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG) (Figura 8) e uma mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico, além da quercetina-3-O-rhamnopiranosídeo (quercetrina), um flavonóide comumente encontrado em espécies vegetais.

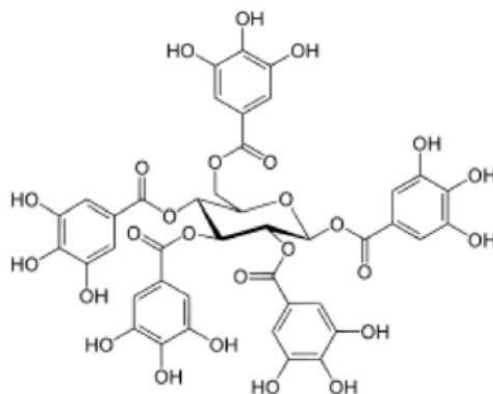


Figura 8: Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG)
Fonte: Souza, 2012.

No óleo essencial das folhas de *M. urundeuva*, o principal constituinte encontrado (78,8%) foi o monoterpreno δ -3-careno (Figura 9), ao qual é atribuída a alta atividade antibacteriana deste óleo. Além do δ -3-careno, foram identificados outros constituintes: mirceno (4,2%), limoneno (0,2%), β -Phellandreno (3,0%), α -Terpinoleno (4,8%), β -Elemeno (0,7%), (*E*)-Cariofileno (1,1%), β -Camigreno (0,5%) e β -Selineno (2,5%) (Montanari et al., 2012).

Figura 9: Estrutura do monoterpreno δ -3-careno

Na região do médio rio doce, além de outras regiões do estado de Minas Gerais é observada a formação de fragmentos monodominados pela aroeira (Valente, 2005). O fenômeno conhecido como monodominância é observado em ambientes que apresentam mais de 50% do número de indivíduos pertencentes a uma única espécie (Hart et al., 1989) No município de Tumiritinga (MG) esta espécie ocupa uma área total que representa 22% da cobertura do solo de todo o município (Oliveira et al., 2013). A predominância da aroeira também é observada na região de Aimorés-

MG, indicando possíveis interações de natureza alelopática neste ecossistema (Figura 10).



Figura 10: Ambiente dominado pela espécie *M.urundeuva* Fonte: Felipe Pinho de Oliveira (2013).

Para a avaliação de tal fenômeno, é muito interessante que sejam feitos estudos preliminares de caracterização química e fitotóxica das diferentes partes da planta. Este estudo visa contribuir amplamente para a identificação das interações químicas que estão resultando na monodominância de *M. urundeuva*, que então deverá ser avaliada em ensaios reproduzindo-se as condições mais similares possíveis em relação às do ambiente natural.

Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho é investigar o potencial fitotóxico das folhas de aroeira. Os objetivos específicos são:

- a) Estudar a fitotoxicidade do extrato bruto das folhas;
- b) Realizar o fracionamento do extrato e estudar a fitotoxicidade das frações obtidas;
- c) Caracterizar as frações de maior atividade e identificar substâncias com potencial atividade fitotóxica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Generalidades metodológicas

2.1.1. Métodos cromatográficos

Foram utilizadas placas de sílica gel com 0,25 mm de espessura, para cromatografia em camada delgada (CCD) analítica (sílica-gel 60 G-F254). As placas foram reveladas utilizando irradiação de luz ultravioleta e os seguintes reagentes:

- Vanilina 1% (p/V) e ácido sulfúrico 5% (V/V) em etanol
1,0 g de vanilina e 5,0 mL de ácido sulfúrico foram solubilizados em 200 mL de etanol. A cromatoplaça é mergulhada na solução reveladora e em seguida é aquecida. É um reagente geral, mas também pode detectar terpenóides, derivados de fenilpropanos e fenóis. O aparecimento de manchas de coloração vermelha, após aquecimento, observadas sob luz visível, indica a presença de taninos condensados (NASCIMENTO, 2008).
- Cloreto férrico 1% (p/V) em metanol
Solubilizou-se 1,0 g de FeCl_3 em 100 mL de metanol. A solução foi armazenada em geladeira até o momento do uso. As placas foram reveladas borrifando-as com a solução. O aparecimento de manchas de coloração azul arroxeada, observadas após secagem ao ar e sob luz visível, indica a presença de taninos e polifenóis (NASCIMENTO, 2008).

Para a filtração gradiente (coluna filtrante) foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh ou 230-400 mesh) como fase estacionária. Os eluentes estão descritos posteriormente.

Na cromatografia por exclusão de tamanho, foi utilizado Sephadex LH-20 da Sigma como fase estacionária. Para o preparo do gel, este foi intumescido previamente por 24 horas com metanol e em seguida, transferido para a coluna de vidro até se obter a sedimentação total do suporte. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente de fase móvel e então aplicada suavemente no topo da coluna até a penetração completa no suporte. Em seguida procedeu-se a eluição com solventes escolhidos.

Os experimentos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

foram realizados em aparelho Shimadzu com detector DAD-UV nos comprimentos de onda de 280 e 360 nm, utilizando colunas C18 Varian 4,6 x 250 mm (5 µm) (analítica), e para as purificações coluna Supelcosil LC-18 10 x 250 mm (5 µm) (semi- preparativa) e pré-coluna Nucleosil 5 sil 4 x 30 mm (5 µm). As fases móveis utilizadas para purificação das frações foram escolhidas por CLAE analítica, utilizando loop de 20 µL, fluxo de 1,0 mL/min, concentração de 2000 ppm.

Para a cromatografia em fase gasosa (CG) , foi utilizado um cromatógrafo a gás SHIMADZU GCMS-QP5050A acoplado a espectrômetro de massas, com coluna capilar de sílica fundida SE-54 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N₂ sob fluxo de 1,6 mL.min⁻¹; temperatura do injetor 290 °C, temperatura do detector 290 °C; temperatura inicial da coluna 80 °C, isoterma por 5 min., seguido de aquecimento a 4 °C min⁻¹ até 285 °C, mais isoterma por 100 min.

Todos os solventes utilizados foram de grau P.A. e de grau CLAE.

2.1.2. Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

Os espectros no ultravioleta foram obtidos no modo de transmitância usando cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm em um espectrógrafo OceanOptics (USB4000-UV-VIS). A região espectral investigada foi de 180 a 890 nm, com incremento de 0,166 nm. Os espectros foram obtidos pelo software SpectraSuite Spectroscopy Operating, onde foram obtidos os valores de absorbância.

2.1.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro VARIAN 660-IR com acessório PIKE Gladi ATR (Departamento de Química - UFV).

2.1.4. Espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (EM-EI)

Os espectros de massas foram obtidos em um equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV.

2.1.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz), de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300 do Departamento de Química - UFV. Foi utilizado como solvente metanol deuterado.

2.2. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Myracrodruonurundeuva* foram coletadas na cidade de Aimorés-MG, na região do médio Rio Doce, em março de 2013, no Instituto Terra e, em seguida, foram secas em estufa de fluxo de ar durante o período de 20 dias e trituradas até a obtenção de um pó fino de coloração verde escuro que foi armazenado em câmara fria a 5 °C. Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário VIC do departamento de Biologia Vegetal (DBV), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o número de registro VIC 30170.

2.3. Obtenção do extrato bruto

O material vegetal (2,8 Kg) foi macerado à temperatura ambiente com etanol 95% ($V_1 = 4 \text{ L}$), com agitação inicial e repouso durante sete dias. O líquido foi separado do sólido decantado e filtrado á vácuo. A solução resultante foi concentrada à exaustão em evaporador rotativo a 45 °C sob pressão reduzida para a obtenção do extrato bruto (37,8 g).

O sólido decantado remanescente da primeira extração foi submetido, sob as mesmas condições, à maceração por mais duas vezes com etanol 95% ($V_2 = 1 \text{ L}$ e $V_3 = 2 \text{ L}$) e, após a retirada do solvente em evaporador rotativo, foram obtidos 53,7 g e 74,5 g de extrato bruto, respectivamente, na segunda e terceira extração. As massas obtidas nas três extrações foram reunidas, totalizando 156,6 g de extrato bruto. A Figura 11 ilustra as etapas da extração e fracionamento do extrato bruto de *M. urundeuva*.

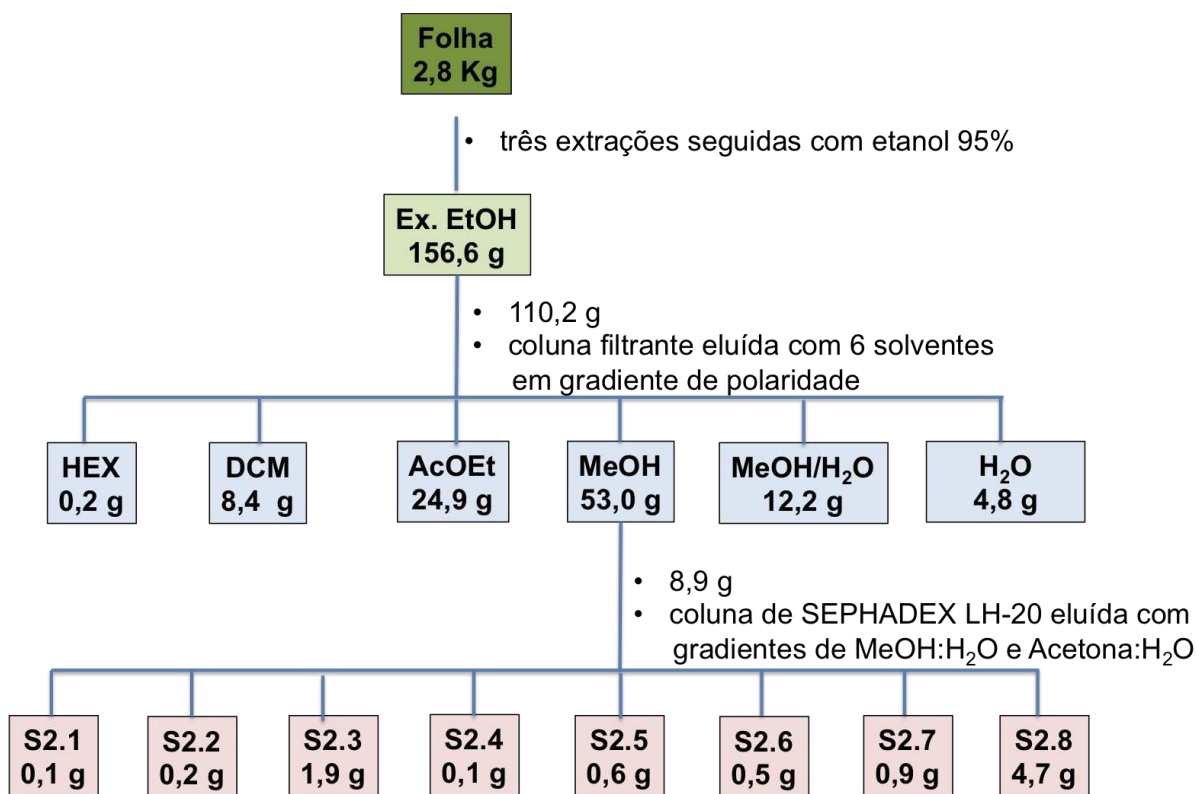


Figura 11: Fluxograma de fracionamento do extrato bruto de *Myracrodruonurundeuva*

2.4. Fracionamento do extrato bruto de *Myracrodruonurundeuva*

2.4.1. Filtração gradiente em funil de placa sinterizada (coluna filtrante)

Após ser incorporado na sílica, o extrato bruto foi fracionado à vácuo em funil de placa sinterizada, empacotado com fase estacionária de sílica gel (400 g) e eluído com 1000 mL de cada um dos seguintes solventes, em ordem crescente de polaridade: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH), MeOH:H₂O 1:1 e H₂O. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo, a 45 °C, sob pressão reduzida e foram obtidas seis frações denominadas HEX (159,6 mg), DCM (8,4 g), AcOEt (24,9 g), MeOH (53,0 g), MeOH/H₂O (12,2 g) e H₂O (4,8 g).

2.4.2. Cromatografia em coluna por exclusão

Com base nos resultados da coluna filtrante e dos ensaios biológicos (Seções 3.3 e 3.4), o extrato metanólico (MeOH) foi fracionado em coluna de vidro (d = 4,7 cm)

preenchida com Sephadex LH-20[®] (120g) e eluída com um gradiente de metanol:água e acetona:água, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Eluição da coluna cromatográfica

Ordem de Eluição	Eluentes	Proporção	Volume (mL)
1		1:0	500
2	MeOH:H ₂ O	8:2	200
3		9:1	200
4		8:2	200
5	Acetona:H ₂ O	7:3	200
6		1:1	150

As frações foram coletadas em 87 tubos de ensaio e aquelas que apresentaram R_F semelhante em análise por CCD, utilizando como eluente uma mistura de CHCl₃:MeOH:H₂O nas proporções 7,0:2,5:0,5 e 6,5:3,0:0,5 e como revelador solução ácida de vanilina, foram agrupadas.

Após a retirada do solvente em evaporador rotativo, a 45°C e sob pressão reduzida, foram obtidas oito frações denominadas de S2.1 (119,8 mg), S2.2 (163,8 mg), S2.3 (1,9 g), S2.4 (106,4 mg), S2.5 (549,6 mg), S2.6 (501,6 mg), S2.7 (908,9 mg) e S2.8 (4,7 mg). As frações foram submetidas a CCD, utilizando fase móvel de CHCl₃:MeOH:H₂O (7,0:2,5:0,5) e como revelador FeCl₃ 1% em metanol, para detectar a presença de compostos polifenólicos.

2.4.3. Fracionamento da fração S2.7 por CLAE-UV

A amostra S2.7 foi fracionada (Figura 12) por CLAE semi-preparativa. A fase móvel foi constituída por uma mistura de MeOH:H₂O na proporção 1:4. Os principais picos foram coletados e os solventes foram retirados em evaporador rotativo, gerando quatro frações denominadas F1 (327,3 mg), F2 (9,5 mg), F3 (2,5 mg), F4 (0,5 mg).

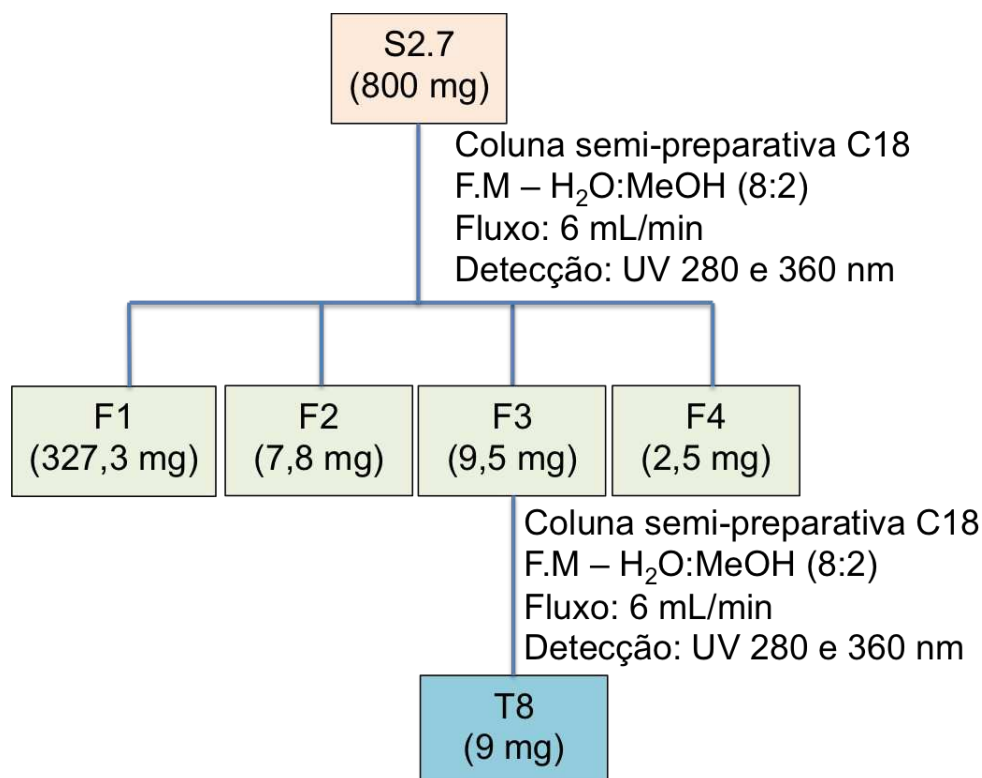


Figura 12: Fluxograma da purificação da fração S2.7

2.4.3.1. Purificação da fração F3 por CLAE-UV

A fração F3 (9,5 mg) foi purificada (figura 8) por CLAE-UV semi-preparativa. A fase móvel foi constituída por uma mistura de MeOH:H₂O na proporção 1:4. Foi coletado um pico em aproximadamente 8 minutos, que foi denominado T8. Essa fração foi analisada por CLAE-UV analítica, que indicou boa pureza. Assim, T8 foi submetida a análise por RMN de ¹H e ¹³C e por espectrometria de massas.

Dados referentes ao composto T8:

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (J/Hz): 3,81(s, 3H, CH₃); 7,04 (s, 2H, CH sp²)

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (J/Hz): 50,8 (s, CH₃); 108,6 (s, 2C, C-2/C-6); 120,0 (s, C-1); 138,3 (s, C-4); 145,1 (s, 2C, C-3/C-5); 167,6 (s, carbonila).

EM, m/z (%): 184 (30) (C₈H₈O₅) [M⁺]; 153(47); 125 (15); 44 (100).

2.4.4. Derivatização da fração S2.8 e análise por CG-MS

Foi realizado um processo de derivatização com a fração S2.8, como no procedimento realizado por Marín-Loaiza et al. (2008), no qual os compostos são dissolvidos em 100µL de *N*-meill-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) a 75 °C por 30 min e então diretamente analisadas por GC-MS, com adaptações.

A fração S2.8 foi dissolvida em 100 µL de piridina anidra e 150 µL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) a 70 °C por cerca de 30 minutos, para posterior injeção em Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massa, em coluna DB5 (30 m x 0,25 µm x 0,25 µm). No cromatograma foram observados cinco picos principais, para os quais foram obtidos os espectros de massas.

2.5. Ensaio biológicos

2.5.1. Teste de germinação com o extrato bruto

Para avaliar a atividade fitotóxica das folhas de Aroeira, experimentos foram realizados no Departamento de Química da UFV, a fim de verificar o efeito do extrato bruto sobre a germinação e o crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de pepino e sorgo.

Sementes comerciais de pepino (*Cucumis sativus*) e de sorgo (*Sorghum bicolor*) foram utilizadas nos bioensaios de crescimento e germinação. As sementes de pepino foram obtidas em lojas de produtos agrícolas e o mesmo lote foi utilizado em todos os ensaios para minimizar possíveis diferenças na germinação. Já as sementes de sorgo foram obtidas no Centro Nacional de Milho e Sorgo (Embrapa/Sete Lagoas-MG).

Foram utilizadas placas de Petri contendo papel Germitest[®], previamente lavadas, secas em estufa a 50 °C por 12 h e esterilizadas com etanol. Em cada placa foram colocadas 20 sementes da espécie-alvo escolhida (sorgo e pepino) na presença do extrato bruto de *M. urundeuva* em diferentes concentrações.

Para a montagem dos experimentos, foi preparada uma solução 1000 ppm do extrato bruto em solução aquosa 0,2% de DMSO (dimetilsulfóxido), que foi diluída para as concentrações de 500, 250, 125 e 50 ppm.

Para cada concentração foram preparadas quatro placas e mais quatro para o

controle com solução aquosa de DMSO 0,2%. Foram utilizadas placas de petri de 9 cm de diâmetro e o volume de solução aplicado a cada placa foi de 5 mL.

As placas devidamente lacradas foram armazenadas em câmara de germinação tipo BOD a 25 °C, sem fotoperíodo. Conforme descrito por Souza et al. (2008), a germinação foi avaliada no 7º dia após o início do ensaio e as sementes germinadas foram contabilizadas e as plântulas foram fotografadas e medidas com auxílio do software associado ao sistema Fitomed®. Foram consideradas germinadas todas as sementes que apresentaram tegumento rompido com emissão da radícula com extensão de, no mínimo, 50% do tamanho da semente (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Ao final do experimento, calculou-se a porcentagem de germinação das sementes e a atividade fitotóxica das soluções na inibição/estímulo do crescimento de radículas e hipocótilos das plântulas de *Sorghum bicolor* e *Cucumis sativus*. A atividade fitotóxica é expressa pela porcentagem de inibição, que refere-se à variação entre o crescimento das sementes germinadas na presença dos extratos com relação ao controle. Valores positivos indicam inibição e valores negativos indicam estímulo no crescimento das plântulas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições tanto para a germinação quanto para o crescimento. As placas com as sementes representaram as unidades experimentais. Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de solução aquosa do extrato bruto de *M. urundeuva* aplicadas às placas.

Foi calculada a porcentagem de inibição do desenvolvimento das plântulas causada pelos aleloquímicos presentes no extrato. O cálculo foi realizado comparando-se o crescimento das plântulas dos tratamentos com as do controle tanto da parte aérea como da radicular através da equação (1). O resultado positivo indica inibição do crescimento e o negativo indica estímulo do crescimento.

$$\% \text{ Inibição} = - [(L_c - L_1)/L_c] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

L_1 = comprimento da radícula ou do hipocótilo em mm

L_c = comprimento da radícula ou do hipocótilo do controle em mm

A análise estatística foi feita com o auxílio do software R. Os dados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados de porcentagens de germinação e de inibição adotou-se a utilização do desvio-padrão.

2.5.2. Teste de germinação com as frações da coluna filtrante

Para avaliar a atividade fitotóxica das frações obtidas do extrato bruto de aroeira, experimentos foram realizados no Departamento de Química da UFV, a fim de verificar o efeito de tais frações sobre o crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de sorgo (*Sorghum bicolor*), pepino (*Cucumis sativus*), variedade caipira da marca TopSeed e cebola (*Allium cepa*), variedade texasearly. As sementes de cebola e pepino foram obtidas em lojas de produtos agrícolas, prezando a utilização do mesmo lote nos ensaios, para minimizar possíveis diferenças de germinação. Já as sementes de sorgo foram adquiridas no Centro Nacional de Milho e Sorgo (Embrapa/Sete Lagoas-MG) e estocadas a 5°C.

As sementes de sorgo foram submetidas a um pré-tratamento para profilaxia (Gabriel et al., 2002), utilizando solução aquosa comercial de hipoclorito de sódio 2,5 % (m/m). Para tanto, as sementes foram colocadas em um béquer e adicionou-se a solução em quantidade suficiente para cobri-las. A solução foi agitada manualmente por dois minutos e em seguida filtrada em peneira para a remoção do hipoclorito. Em seguida as sementes foram recolocadas no bequer, que foi preenchido com água destilada fervida e resfriada por duas vezes, para remover resquícios de hipoclorito de sódio. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e, em seguida, as sementes foram colocadas para secar ao ar em papel toalha.

Para o experimento de germinação e crescimento de sementes foram utilizadas placas de Petri contendo papel Germitest®, previamente lavadas, secas em estufa a 50 °C por 12h e esterilizadas com etanol. Em cada placa foram colocadas 20 sementes da espécie-alvo escolhida (sorgo, pepino ou cebola) na presença das soluções-teste em diferentes concentrações, que consistiam nas frações obtidas da coluna filtrante.

Para a montagem dos experimentos, foram preparadas soluções 1000 ppm em solução aquosa 0,2% de DMSO das frações DCM, AcOEt, MeOH, MeOH/H₂O e H₂O. Todas as soluções foram diluídas para as concentrações de 500, 250, 125 e 50 ppm.

Para cada fração foram preparadas cinco réplicas por concentração e mais

cinco para o controle com solução aquosa de DMSO 0,2%. Nos experimentos com cebola e sorgo, foram utilizadas placas de petri de 9 cm de diâmetro e o volume de solução aplicado a cada placa foi de 5 mL. Já para as sementes de pepino, foram utilizadas placas de 15 cm de diâmetro e o volume de solução aplicado a cada placa foi de 9mL.

As placas devidamente lacradas foram armazenadas em câmara de germinação tipo BOD a 25 °C, sem fotoperíodo. Após cinco dias, cada semente germinada foi contabilizada e as plântulas foram fotografadas e medidas com auxílio do software associado ao sistema Fitomed®.

Ao final do experimento, foi calculado a porcentagem de germinação e a atividade fitotóxica das soluções na inibição/estímulo do crescimento de radículas e hipocótilos das plântulas de *Sorghum bicolor*, *Cucumissativuse* *Allium cepa*, expressa pela porcentagem de inibição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições em esquema fatorial 5 x 5, sendo o primeiro fator constituído por diferentes extratos e o segundo constituído por diferentes concentrações. As placas com as sementes representaram as parcelas. Os tratamentos representaram as concentrações das soluções dos diferentes extratos de *M. urundeuva* aplicados às placas.

O cálculo da porcentagem de inibição sobre o crescimentodas plântulas e a análise estatística foram feitos conforme descrito na seção 2.5.1.

3. Resultados e Discussão

3.1. Obtenção do extrato bruto

Neste trabalho, optou-se por produzir o extrato utilizando as folhas de *M. urundeuva* na busca por compostos bioativos potencialmente envolvidos nas interações ecológicas estabelecidas pela planta no ambiente em que foi coletada, uma vez que as folhas representam uma grande parte da matéria orgânica produzida pela vegetação. Além disso por tratar-se de uma espécie caducifólia, a biomassa produzida afeta diretamente no crescimento de mudas no entorno de várias maneiras (REIGOSA et al., 2013).

A extração com etanol 95% apresentou um rendimento de 5,6% em relação à massa seca de material vegetal. Misturas etanol:água são capazes de extrair compostos em um espectro relativamente amplo de polaridades e são muito utilizadas na extração de compostos fenólicos em geral (CERUKS et al., 2007; SOUZA et al., 2007; SPAGOLLA et al., 2009). Contudo, o conteúdo de metabólitos secundários pode variar bastante em função de fatores ambientais como clima, altitude, local e época de coleta (FILHO e YUNES, 1997).

A extração de compostos polifenólicos pode ser dificultada quando os mesmos tornam-se fortemente ligados a fibras ou proteínas durante o processo de secagem do material vegetal (SANTOS-BUELGA e WILLIAMSON, 2003). Segundo Haslam (1989), na extração de taninos, seja qual for o método escolhido, acredita-se que a quantidade de moléculas extraída certamente será pequena em comparação a quantidade remanescente no material vegetal.

Segundo Reigosa, Sánchez-Moreiras e González (1999), muitos compostos fenólicos são liberados pelas plantas simultaneamente e de maneira contínua, o que pode indicar que haja sinergismo na atuação dos mesmos. Nesse sentido, a realização de fracionamentos bioguiados oferece grande contribuição na investigação da presença de efeitos sinérgicos, uma vez que, se a atividade biológica é calculada em cada etapa, é possível verificar se há aumento ou diminuição da atividade conforme a amostra vai sendo purificada (ELOFF, 2004).

É importante ressaltar ainda, que as substâncias extraídas fazendo uso de solventes orgânicos não necessariamente são as mesmas liberadas pela planta, pois tal extração não reproduz o processo natural de solubilização de aleloquímicos em seu ambiente natural, onde as condições de produção e liberação de metabólitos

secundários são governadas pelas interações ecológicas estabelecidas e pelas condições ambientais (REIGOSA et al., 2013). Entretanto, um estudo preliminar da composição química da planta é de fundamental importância na investigação das substâncias envolvidas em tais interações.

3.2. Avaliação da atividade fitotóxica do extrato bruto

Neste ensaio preliminar, avaliou-se a atividade fitotóxica do extrato bruto de *M. urundeuva* em diferentes concentrações. Como espécies-alvo, foram escolhidas duas plantas de germinação e crescimento rápido e uniforme: uma monocotiledônea (sorgo) e uma dicotiledônia (pepino). Por apresentarem um grau de sensibilidade que permite respostas a baixas concentrações de aleloquímicos, tais espécies são consideradas plantas-teste (Macías, et al., 2001) muito amplamente utilizadas em vários estudos visando a descoberta de novas substâncias fitotóxicas (ALVARENGA et al., 2009; et al.; BARBOSA et al., 2005).

As sementes de pepino não apresentaram redução em sua germinação quando submetidas às diferentes concentrações do extrato bruto (Apêndice A). Tanto o controle quanto os tratamentos apresentaram 100% de germinação. Já para as sementes de sorgo, o controle apresentou média de 77% de germinação e houve pouca redução na germinação dos tratamentos em relação ao mesmo (Figura 13). A menor média de porcentagem de germinação foi de 53%, observada no tratamento com o extrato bruto a 1000 ppm.

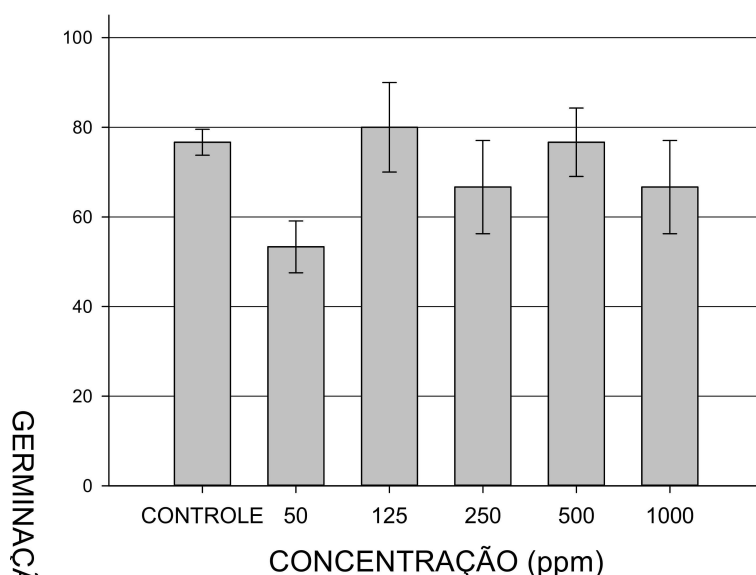


Figura 13: Porcentagem de germinação de sementes de sorgo sujeitas a tratamento com o extrato bruto de *M. urundeuva* a diferentes concentrações

Carmoet al. (2007) observaram que o extrato de *Ocoteaodorifera*, constituído principalmente de compostos fenólicos como flavonóides e taninos, provocou pouca redução na germinação de sementes de sorgo, que germinaram cerca de 30% menos do que o controle. Contudo, Ferreira e Aquila (2000) afirmam que, em geral, ensaios de germinação são menos sensíveis à ação de aleloquímicos do que os ensaios que avaliam o desenvolvimento das plântulas.

Na Figura 14, foi observado que em concentrações mais baixas, a porcentagem de inibição foi mais expressiva para o pepino do que para o sorgo, enquanto que a concentrações mais altas, o crescimento do sorgo sofreu maior inibição que o do pepino. Além disso, a diminuição na concentração do extrato provocou relativo aumento na porcentagem de inibição de ambas as partes de sementes de pepino. Esse mesmo comportamento foi observado por Belineloet al. (2008) para radículas de sorgo e pepino submetidas à ação do extrato bruto de *Arctiumminus*, rico em compostos carboxílicos, que provocou maior inibição no crescimento das mesmas a 1 mg L⁻¹ do que a 100 mg L⁻¹, além de provocar maior inibição no pepino do que no sorgo.

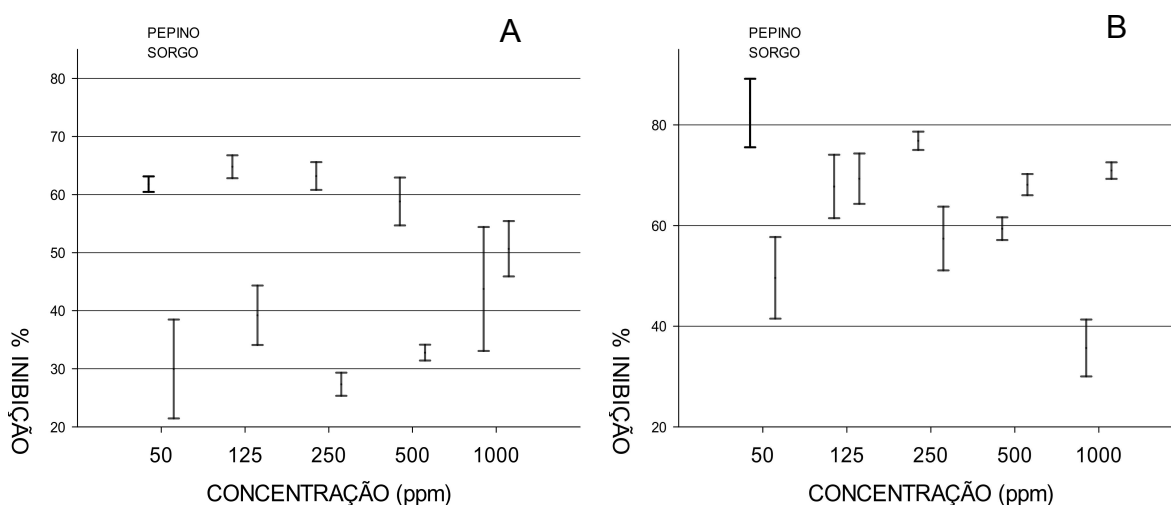


Figura 14: Inibição no crescimento de hipocótilo (A) e radícula (B) de sorgo e pepino sujeitas ao ensaio com o extrato bruto de *M. urundeuva*

De maneira geral, para as duas espécies-alvo houve maior inibição no crescimento da radícula do que da parte aérea. Inibições acima de 60% foram observadas para o hipocótilo do pepino (Figura 14-A). Contudo, o maior percentual de inibição de todos os tratamentos foi observado para radícula do pepino (Figura 14-B), no tratamento com solução do extrato bruto a 50 ppm (82,4%). O crescimento de radículas de sorgo também sofreu alta inibição (70,9%) na concentração de 1000 ppm. O hipocótilo do sorgo, no tratamento a 250 ppm foi o que sofreu menos

inibição, apresentando um crescimento 27,3% menor que o do controle (Apêndice B).

O crescimento dos tratamentos (Tabela 2) foi inferior ao do controle em todas as concentrações das soluções do extrato bruto, tanto para radícula quanto para hipocótilo das duas espécies testadas. Não houve diferença significativa entre as médias de comprimento de radículas de sorgo, o que sugere que o extrato bruto tenha provocado inibição no crescimento com a mesma intensidade em todas as concentrações empregadas. Já para o hipocótilo, houve diferença significativa entre as médias a 250 e 1000 ppm. As demais médias não diferiram significativamente.

Foi observado aumento nas médias de comprimento de radículas e hipocótilos de pepino em função do aumento da concentração (Figura 15), o que indica que em concentrações mais altas do extrato bruto ocorreu menor inibição no desenvolvimento das sementes. Macías et al. (1999) observaram que sementes de sorgo submetidas a tratamentos com a lactonasesquiterpênica Annuinona D apresentaram maiores comprimentos de radículas em soluções mais concentradas do que nas mais diluídas, devido à ação estimulatória desse composto.

Tabela 2: Crescimento de sementes de sorgo e pepino sujeitas ao ensaio com o extrato bruto em diferentes concentrações

Comprimento* (mm)				
	PEPINO		SORGO	
Concentração (ppm)	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula
CONTROLE	23,5 A	51,5 A	29,5 A	29,3 B
50	8,8 C	10,8 C	18,0 BC	13,8 C
125	8,8 C	14,8 C	19,3 BC	10,0 C
250	8,0 C	12,8 C	20,8 B	10,8 C
500	10,5 BC	23,3 BC	18,0 BC	9,3 C
1000	14,8 B	29,5 B	13,3 C	8,5 C
CV (%)	19,5	25,1	16,7	23,0

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

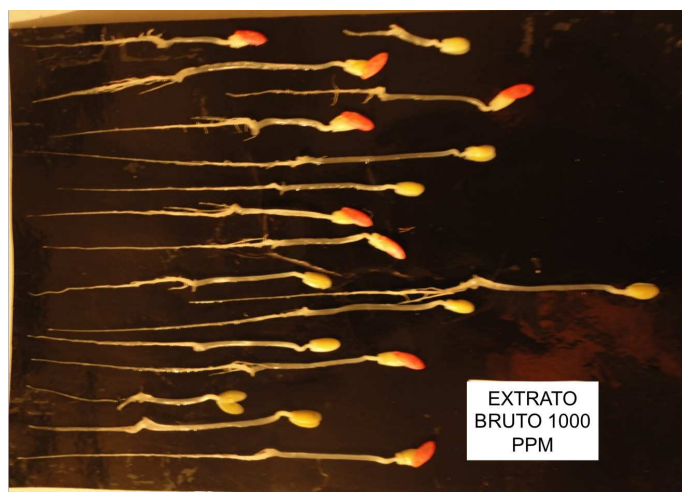


Figura 15: Sementes de pepino germinadas em tratamento com o extrato bruto

Os resultados indicam que, nesse estágio de desenvolvimento, o sistema radicular de sorgo e pepino seja mais sensível aos aleloquímicos presentes no extrato de aroeira do que os hipocótilos. Entretanto, cerca de 85% das investigações em alelopatia no Brasil, avaliadas por Reigosa et al. (2013), relataram efeitos fitotóxicos mais pronunciados em raízes do que na parte aérea de diversas espécies-alvo.

3.3. Fracionamento do extrato bruto em gradiente de polaridades

O fracionamento do extrato bruto resultou na obtenção dos extratos hexânico (HEX), diclorometano (DCM), Acetato de Etila (AcOEt), metanólico (MeOH), metanol/água (MeOH/H₂O) e aquoso (H₂O) (doravante denominados pelos termos designados entre parênteses), como pode ser observado na Tabela 3. Os rendimentos obtidos para os extratos HEX e DCM indicaram baixa concentração de compostos pouco polares ou apolares no extrato bruto. O maior rendimento foi obtido utilizando como solvente o metanol.

Tabela 3: Extratos obtidos após o fracionamento do extrato bruto em coluna filtrante

Extrato	HEX	DCM	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O	H ₂ O
Massa (g)	0,2	8,4	24,9	53,0	12,1	4,8
Rendimento (%)	0,1	5,4	15,9	33,8	7,7	3,1

Os espectros no IV dos extratos obtidos são apresentados na Figura 16. Por tratarem-se ainda de extratos brutos (misturas complexas de compostos), pouca

informação estrutural pode ser obtida. Contudo, a presença ou ausência de algumas bandas pode dizer algo sobre os grupos presentes nas amostras. O espectro do extrato HEX (Figura 16-A) apresenta bandas típicas de ligações C-H. As bandas agudas em 731 e 702 cm^{-1} podem indicar a presença de derivados de benzeno (BARBOSA, 2007).

Os espectros dos extratos DCM (Figura 16-B) e AcOEt (Figura 16-C) apresentaram grande semelhança, indicando que as mesmas classes de compostos podem estar presentes. As bandas características de ligações C-H são predominantes nos dois espectros e provavelmente essas frações são constituídas por compostos pouco polares, pois os espectros não apresentam bandas características de grupos de maior polaridade como hidroxilas ou carbonilas. Não foram observadas bandas intensas nas regiões de 1736 e 1710 cm^{-1} , indicando a ausência de compostos carbonilados.

Os extratos MeOH (Figura 16-D), MeOH/H₂O (Figura 16-E) e H₂O (Figura 16-F) também apresentaram espectro de IV muito similares entre si. Contudo, já é possível a identificação de alguns grupos funcionais de maior polaridade. Bandas de estiramento da ligação O-H, que nesses espectros se apresentam um pouco alargadas, cobrindo a região de 3000 até aproximadamente 3500 cm^{-1} , podem indicar a presença de ácidos carboxílicos (BARBOSA, 2007). A presença de bandas de estiramento da carbonila em 1704 cm^{-1} para o MeOH e em 1697 cm^{-1} para o MeOH/H₂O, corroboram a possibilidade de existirem compostos dessa classe nos extratos. Ainda, nestes espectros são observadas bandas características de estiramento de C=C de compostos aromáticos em 1604 cm^{-1} para o extrato MeOH e em 1604 cm^{-1} para o extrato MeOH/H₂O.

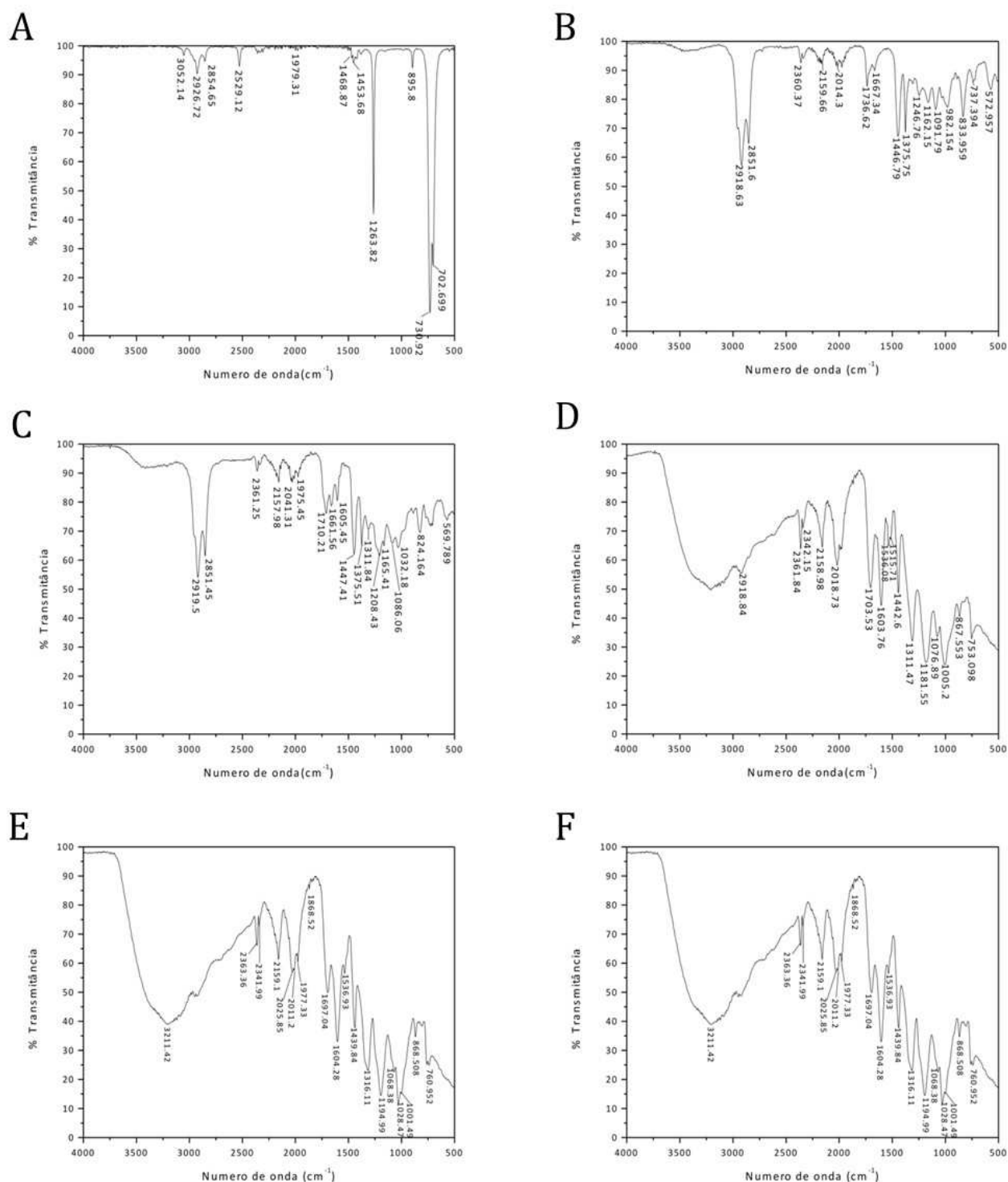


Figura 16 Espectros no IV (ATR) das frações HEX (A), DCM (B), AcOEt (C), MeOH (D) MeOH/H₂O (E) e H₂O (F)

3.4. Atividade fitotóxica dos extratos obtidos da coluna filtrante

A atividade dos extratos DCM, AcOEt, MeOH, MeOH/H₂O e H₂O foi avaliada a cinco diferentes concentrações. Devido á baixa quantidade obtida, o extrato HEX não foi testado neste ensaio. As espécies-alvo utilizadas no ensaio com o extrato

bruto foram mantidas e incorporou-se o uso de sementes de cebola (monocotiledônea), que também é considerada uma planta-teste por apresentar germinação rápida assim como crescimento inicial rápido e uniforme, sendo uma das espécies mais utilizada em estudos de fitotoxicidade no Brasil (Reigosa et al., 2013). Os dois fatores analisados foram a ação dos diferentes extratos (fator 1) e das diferentes concentrações (fator 2) sobre o crescimento de hipocótilos e radículas das sementes. A seguir são apresentados os resultados das resposta de cada espécie-alvo à ação fitotóxica dos aleloquímicos presentes nos extratos.

3.4.1. Pepino

A germinação das sementes de pepino foi estimulada em todos os tratamentos, para todas as concentrações, como mostra a Figura 17.

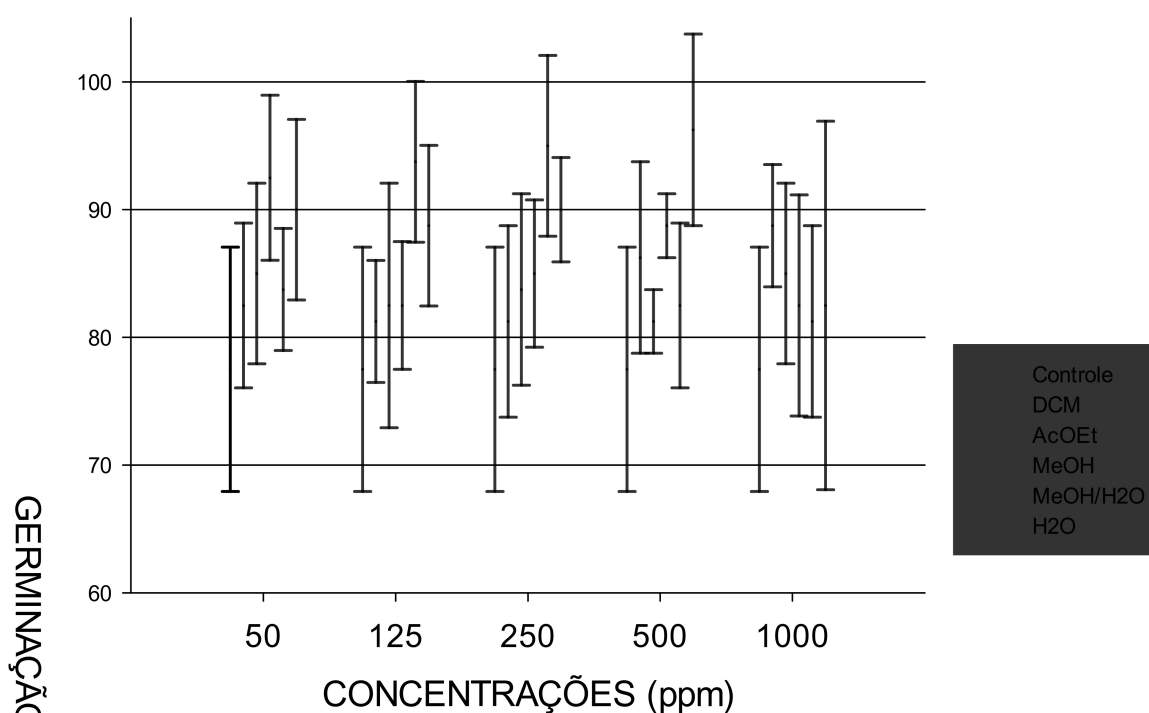


Figura 17: Porcentagem de germinação de sementes de pepino sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* em diferentes concentrações

Todas as médias de germinação foram maiores que a do controle, que foi de 78% (Apêndice C). O maior estímulo observado no tratamento com o extrato H₂O a 500 ppm (96%), que seguido do extrato MeOH/H₂O, foram os que apresentaram as maiores porcentagens de germinação.

De maneira geral, foi observada maior inibição no crescimento da radícula do que da parte aérea em concentrações mais altas e o oposto ocorreu em concentrações mais baixas.

Para o hipocótilo (Figura 18), foi observada uma baixa porcentagem de inibição, em geral com médias abaixo de 30% (Apêndice D). As maiores porcentagens de inibição da parte aérea foram observadas nos tratamentos com os extratos H₂O (38,5%) e MeOH/H₂O (27,5%) a 500 e 1000 ppm, respectivamente.

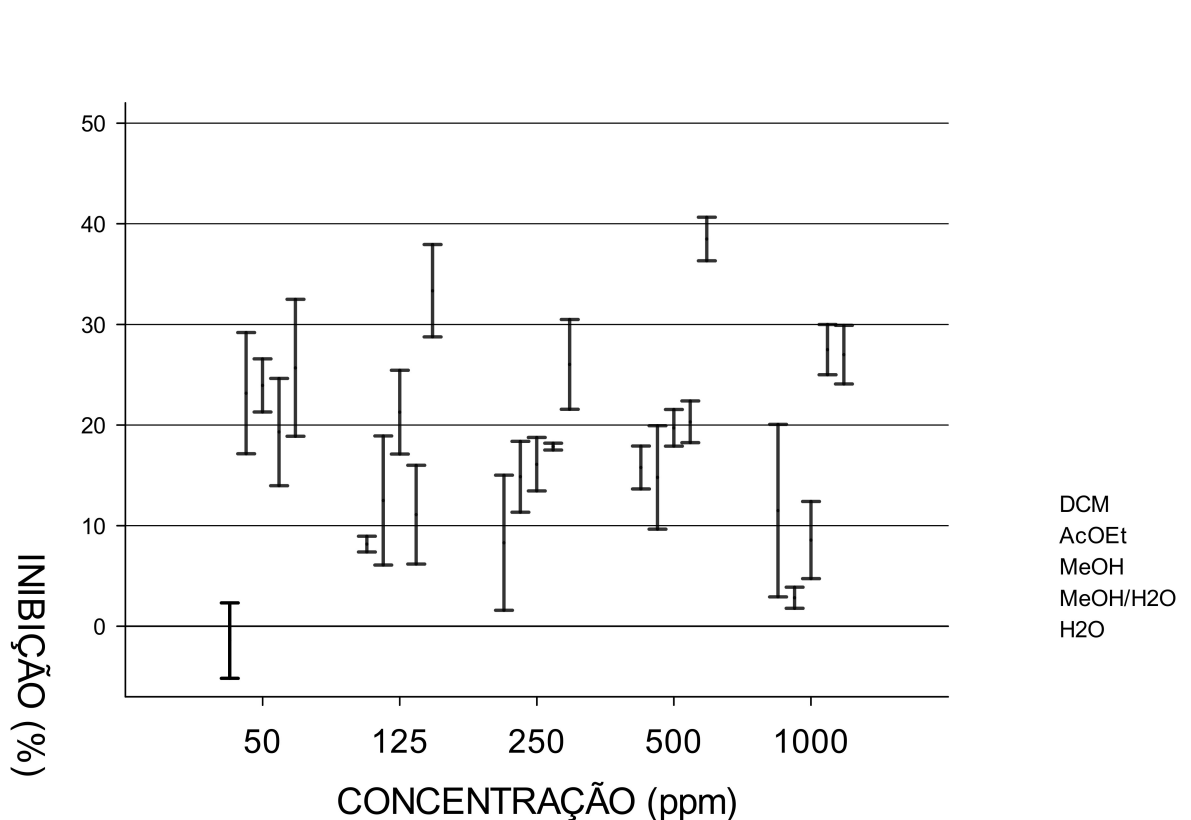


Figura 18 Inibição no crescimento de hipocótilo de sementes de pepino sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* em diferentes concentrações

Já para a radícula (Figura 19), foram observadas porcentagens de inibição de até 50%, sendo que os extratos MeOH/H₂O e H₂O também apresentaram as porcentagens de inibição mais altas na maioria das concentrações (Apêndice E). Foi observado estímulo no crescimento no tratamento com o extrato DCM a 50 ppm (-5,8%) e com o extrato AcOEt a 500 ppm (-4,3%). Tal comportamento também foi observado em radícula de pepino por Ferreira et al. (2000) ao submeter as sementes a tratamento com a quinona conhecida como antrarufina.

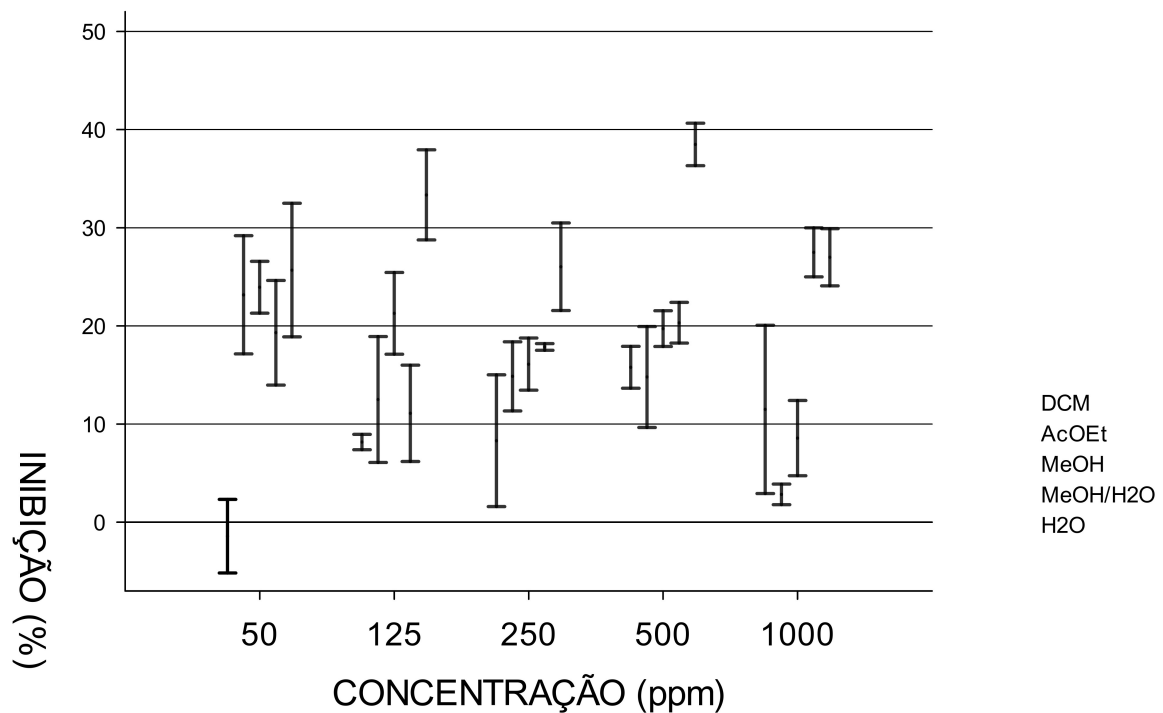


Figura 19: Inibição no crescimento de radícula de sementes de pepino sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* em diferentes concentrações

As médias de crescimento de hipocótilos e radículas de sementes de pepino submetidas à ação dos diferentes extratos (fator 1) e das diferentes concentrações (fator 2) são apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Pela análise de variância, a interação entre os fatores não foi significativa ($p > 0,05$) para os hipocótilos. Logo, os efeitos dos diferentes extratos sobre o crescimento médio dos mesmos independem da concentração empregada. Isso significa que as respostas obtidas para os diferentes extratos serão as mesmas em qualquer uma das concentrações testadas.

A Tabela 4 mostra que houve diferença significativa entre a média do comprimento de hipocótilos no tratamento com o extrato H₂O e as médias dos demais tratamentos, que não diferiram significativamente entre si. O crescimento no extrato H₂O foi menor do que nos demais tratamentos, apresentando uma média de 27,3 mm de comprimento, o que indica que as substâncias presentes nesse extrato apresentam um maior potencial na inibição do crescimento do hipocótilo do pepino.

Tabela 4: Comprimento dos hipocótilos de sementes de pepino submetidas à ação dos extratos de *M. urundeuva* (esq.) a diferentes concentrações (dir.)

EXTRATOS	COMPRIMENTO (mm)	CONCENTRAÇÃO(ppm)	COMPRIMENTO (mm)
DCM	35,6 a	1000	34,2 a
AcOEt	35,3 a	500	31,7 a
MeOH	34,2 a	250	32,9 a
MeOH/H ₂ O	33,0 a	125	33,3 a
H ₂ O	27,3 b	50	33,3 a
CONTROLE	40,7	CONTROLE	40,7
CV (%)	14.1	CV (%)	14,1

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Já para as radículas de pepino, a interação entre os fatores foi significativa ($p < 0,01$) pela análise de variância, indicando a existência de uma dependência entre os efeitos dos mesmos.

A Tabela 5 mostra que para os tratamentos com os extratos AcOEt e MeOH, as médias de crescimento das radículas a diferentes concentrações não foram significativamente diferentes, ou seja, a utilização de qualquer uma das concentrações desses extratos surtirá o mesmo efeito no crescimento. Além disso, a 50 ppm não foi observada diferença significativa entre as médias de crescimento para os diferentes extratos, o que significa que, para esta concentração, todos os extratos exercem o mesmo efeito sobre o crescimento das radículas. Para as outras concentrações, os extratos MeOH/H₂O e H₂O apresentaram as menores médias de comprimento.

Tabela 5: Comprimento (mm) das radículas de sementes de pepino submetidas a ação dos extratos de *M. urundeuva* a diferentes concentrações

EXTRATOS	CONCENTRAÇÃO (ppm)				
	1000	500	250	125	50
DCM	35,5 bB	50,5 abA	57,1 aA	56,6 aA	56,9 aA
AcOEt	56,4 aA	61,5 aA	53,6 abA	52,5 abA	57,8 aA
MeOH	48,7 aA	56,3 aA	52,6 abA	59,2 aA	55,4 aA
MeOH/H ₂ O	30,9 bC	41,6 bBC	39,1 cBC	47,6 abAB	55,1 aA
H ₂ O	31,1 bC	40,6 bBC	43,9 bcAB	41,8 bABC	53,2 aA
CONTROLE	40,7				
CV (%)	14,3				

*Médias seguidas pela mesma letra (colunas - letras minúsculas; linhas - letras maiúsculas) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.2. Sorgo

Foram observadas médias de germinação entre 50% e 70% para as sementes de sorgo (Figura 20). De maneira geral, foi observado estímulo na germinação das sementes sujeitas aos tratamentos. A baixa germinação do controle (49%) pode ser resultado de alterações no padrão de germinação, que ocorrem devido a alterações em diversos fatores como por exemplo, permeabilidade das membranas, respiração, conformação de enzimas e receptores, dentre outros (FERREIRA & ÀQUILA, 2000). Contudo, o único tratamento para o qual foi observada redução na porcentagem de germinação foi com o extrato MeOH/H₂O a 500 ppm, com germinação de 41% (Apêndice F).

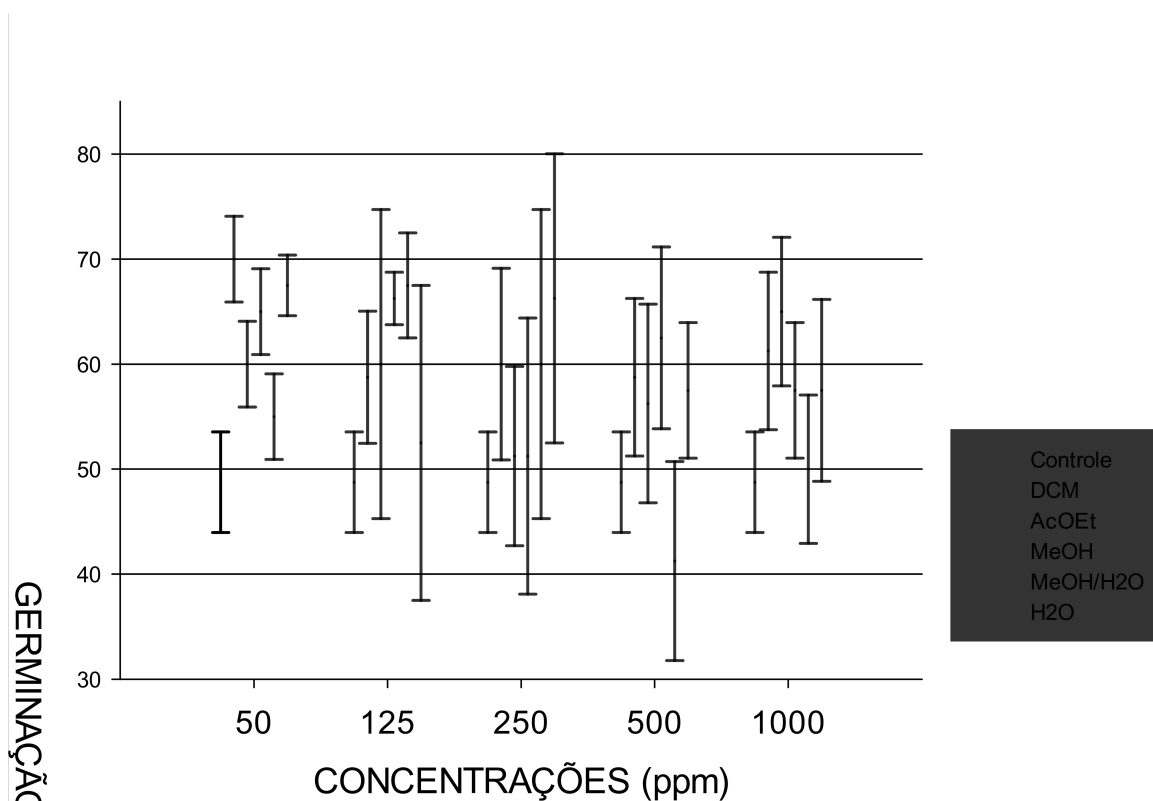


Figura 20: Porcentagem de germinação de sementes de sorgo sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* em diferentes concentrações

De maneira geral, o aumento na concentração dos extratos acarretou aumento na inibição do desenvolvimento das sementes. Foram observadas porcentagens de inibição semelhantes para hipocótilos e radículas, com máximos em torno de 50% de inibição (Figuras 21 e 22).

Para o hipocótilo (Figura 21), os tratamentos com AcOEt e MeOH apresentaram as maiores porcentagens de inibição, com máximas em 51,1 e 49,2%, respectivamente, na concentração de 1000 ppm (Apêndice G).

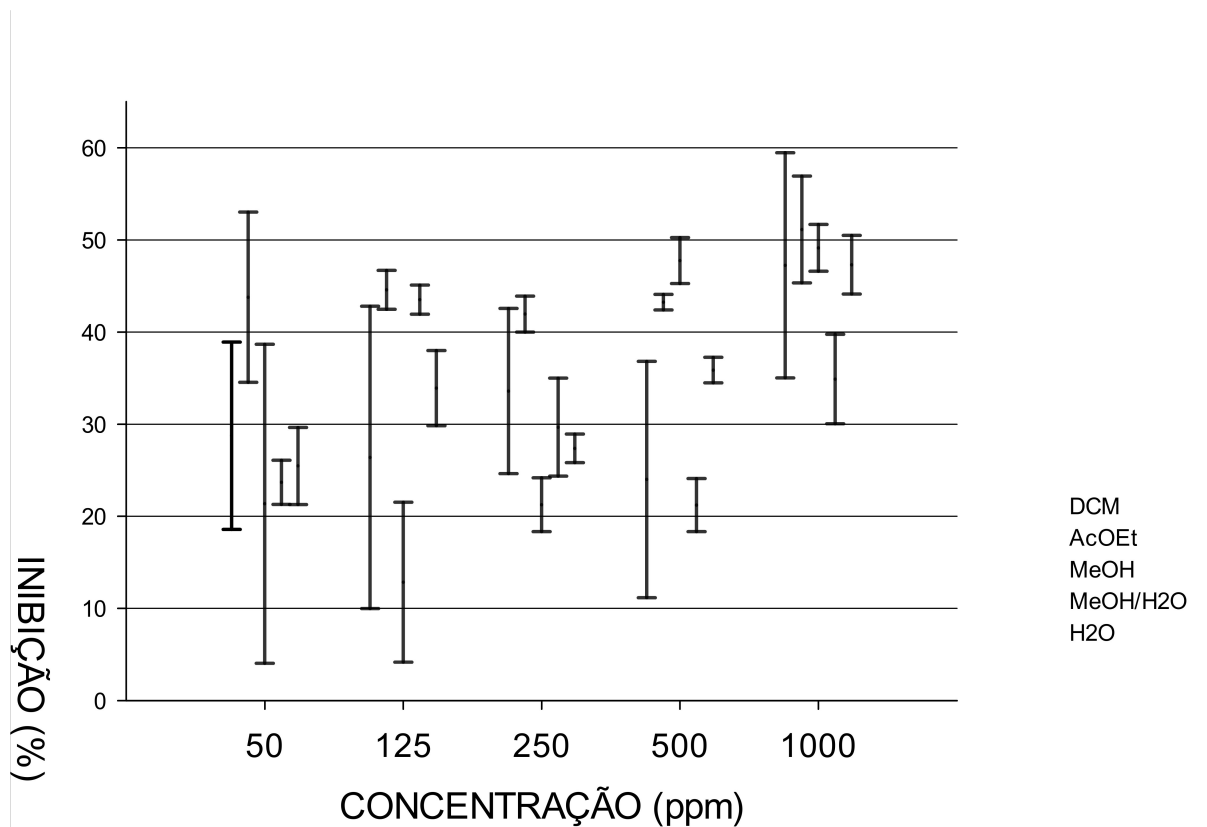


Figura 21 Inibição no crescimento de hipocótilo de sementes de sorgo sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* a diferentes concentrações

A análise da resposta da radícula aos diferentes extratos (Figura 22) mostra que, mais uma vez, os extratos MeOH e MeOH/H₂O apresentaram as maiores porcentagens de inibição (46,0% e 48,0%, respectivamente) a 1000 ppm. A menor inibição (13,3%) foi observada no tratamento com extrato DCM a 50 ppm (Apêndice H).

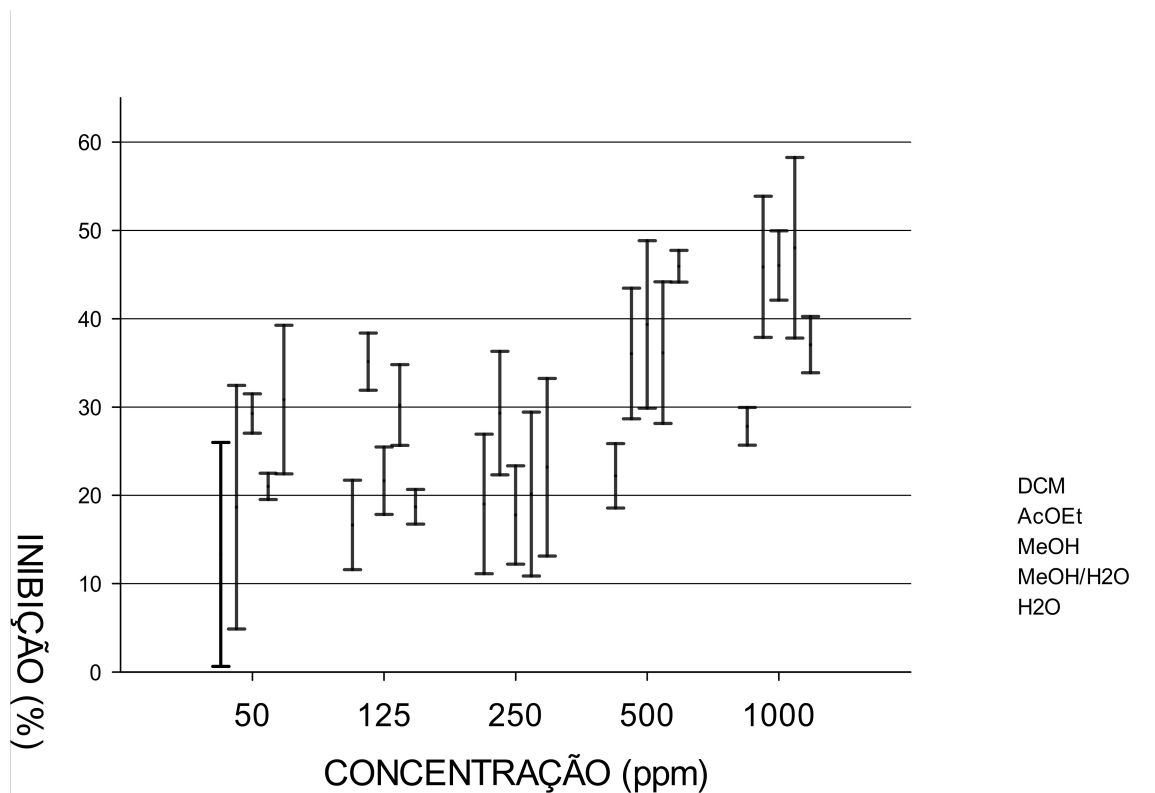


Figura 22: Inibição no crescimento de radícula de sementes de sorgo sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

As médias de crescimento de hipocótilos e radículas de sementes de sorgo submetidas a ação dos diferentes extratos (fator 1) e das diferentes concentrações (fator 2) são apresentadas nas Tabelas 5 e 6. Pela análise de variância, a interação entre os fatores não foi significativa ($p > 0,05$) tanto para o hipocótilo quanto para a radícula.

A Tabela 6 mostra que somente entre o tratamento DCM e os tratamentos AcOEt e H₂O houve diferença significativa entre as médias de comprimento de hipocótilos. As demais médias não diferiram entre si. Entre as concentrações 50, 125 e 250 ppm e a concentração de 1000 ppm também foi observada diferença significativa entre as médias de comprimento. As demais médias não diferiram entre si.

Tabela 6 - Comprimento dos hipocótilos de sementes de sorgo submetidas á ação dos extratos de *M. urundeuva* em diferentes concentrações

EXTRATOS	COMPRIMENTO (mm)	CONCENTRAÇÃO(ppm)	COMPRIMENTO (mm)
DCM	30,7 a	1000	21,8 b
AcOEt	23,9 b	500	26,0 ab
MeOH	28,1 ab	250	27,1 a
MeOH/H ₂ O	26,4 ab	125	29,1 a
H ₂ O	25,4 b	50	30,5 a
CONTROLE	37,5	CONTROLE	37,5
CV (%)	22,3	CV (%)	22,3

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 7 apresenta os resultados da aplicação do teste de Tukey sobre as médias de comprimento de radículas de sorgo. Não foi observada diferença significativa entre as médias dos tratamentos com os diferentes extratos. Contudo, as médias dos tratamentos a 1000 e 500 ppm apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos a 250, 125 e 50 ppm. As demais médias não diferiram entre si. As menores médias de comprimento de radícula foram observadas nas concentrações de 500 e 1000 ppm (29,0 e 34,0 mm, respectivamente). Esses resultados sugerem que nessas concentrações os extratos estejam promovendo maior inibição no crescimento das radículas, conforme previsto pelos gráficos de porcentagem de inibição.

Tabela 7 - Comprimento das radículas de sementes de sorgo submetidas á ação dos extratos de *M. urundeuva* a diferentes concentrações

EXTRATOS	COMPRIMENTO (mm)	CONCENTRAÇÃO(ppm)	COMPRIMENTO (mm)
DCM	38,0 a	1000	29,0 b
AcOEt	37,1 a	500	34,0 b
MeOH	37,0 a	250	40,4 a
MeOH/H ₂ O	37,0 a	125	40,0 a
H ₂ O	36,4 a	50	42,0 a
CONTROLE	48,4	CONTROLE	48,4
CV (%)	18,7	CV (%)	18,7

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.3. Cebola

Para as sementes de cebola, todos os tratamentos apresentaram porcentagens de germinação menores que a do controle, que foi de 71% (Figura 23). Não foram observadas grandes variações nas porcentagens de germinação em função das

concentrações empregadas. A menor porcentagem de germinação foi observada no tratamento com o extrato DCM a 125 ppm (23%) e a maior no tratamento com o extrato MeOH a 250 ppm (70%) (Apêndice I).

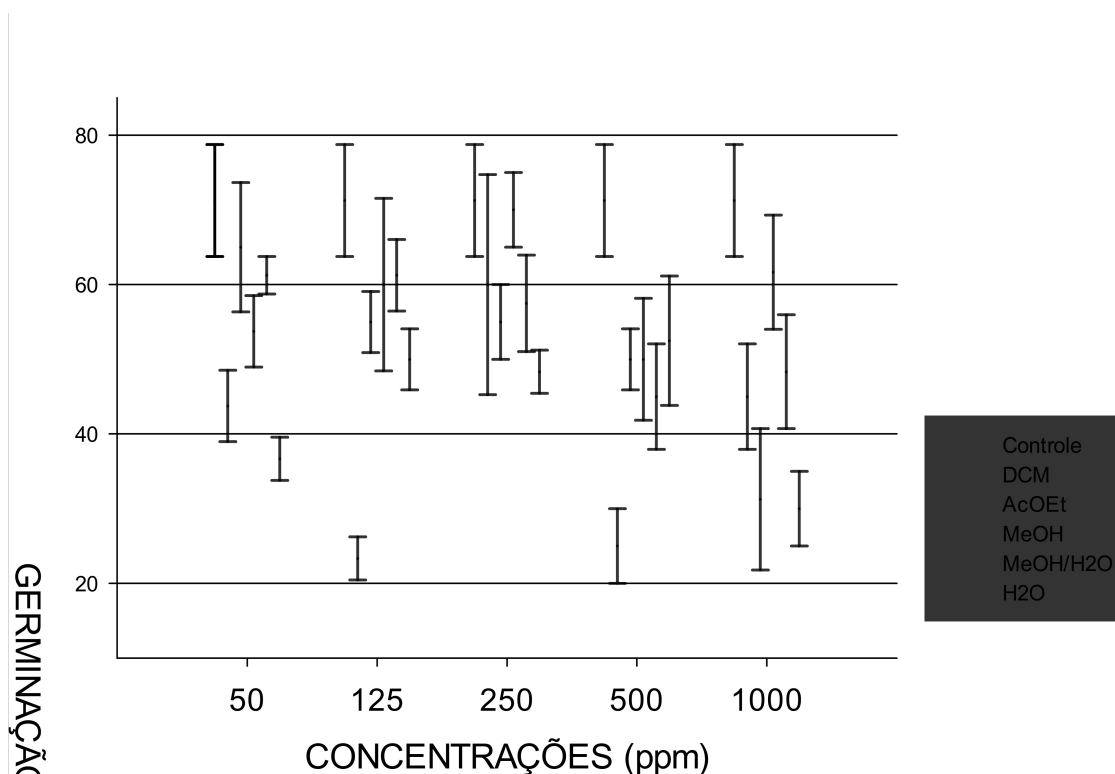


Figura 23: Porcentagem de germinação de sementes de cebola sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

De maneira geral, o aumento na concentração dos extratos acarretou aumento nas porcentagens de inibição. Além disso, foram observadas porcentagens de inibição levemente maiores para a radícula do que para o hipocótilo (Apêndice J).

Para o hipocótilo da cebola (Figura 24), observou-se que a maior porcentagem de inibição foi de 62,6%, para o tratamento com o extrato MeOH a 1000 ppm. Foi observado estímulo de 16,4% no crescimento no tratamento com o extrato AcOEt a 50 ppm (Apêndice L). Esse tipo de resposta estimulatória em baixas concentrações é de ampla ocorrência e pode estar relacionado a diversos mecanismos em nível celular (WEIR et al., 2004). Viecelli e Cruz-Silva (2009) observaram estímulo no desenvolvimento se sementes de alface em tratamentos com extratos de *Salvia officinalis* L. em concentrações mais baixas, enquanto para as concentrações mais altas do extrato foi observada inibição.

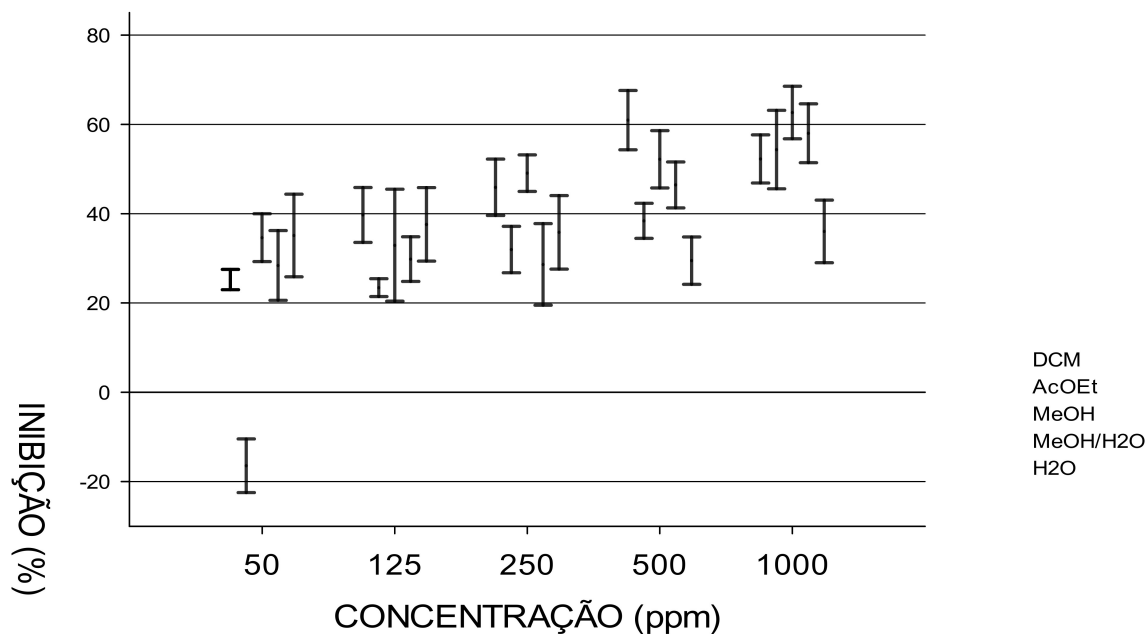


Figura 24: Inibição no crescimento de hipocótilo de sementes de cebola sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Para a radícula (Figura 25), os tratamentos com os extratos DCM, MeOH e MeOH/H₂O apresentaram as maiores porcentagens de inibição no crescimento, sendo que a maior foi de 74,6%, observada no tratamento com o extrato MeOH/H₂O a 1000 ppm.

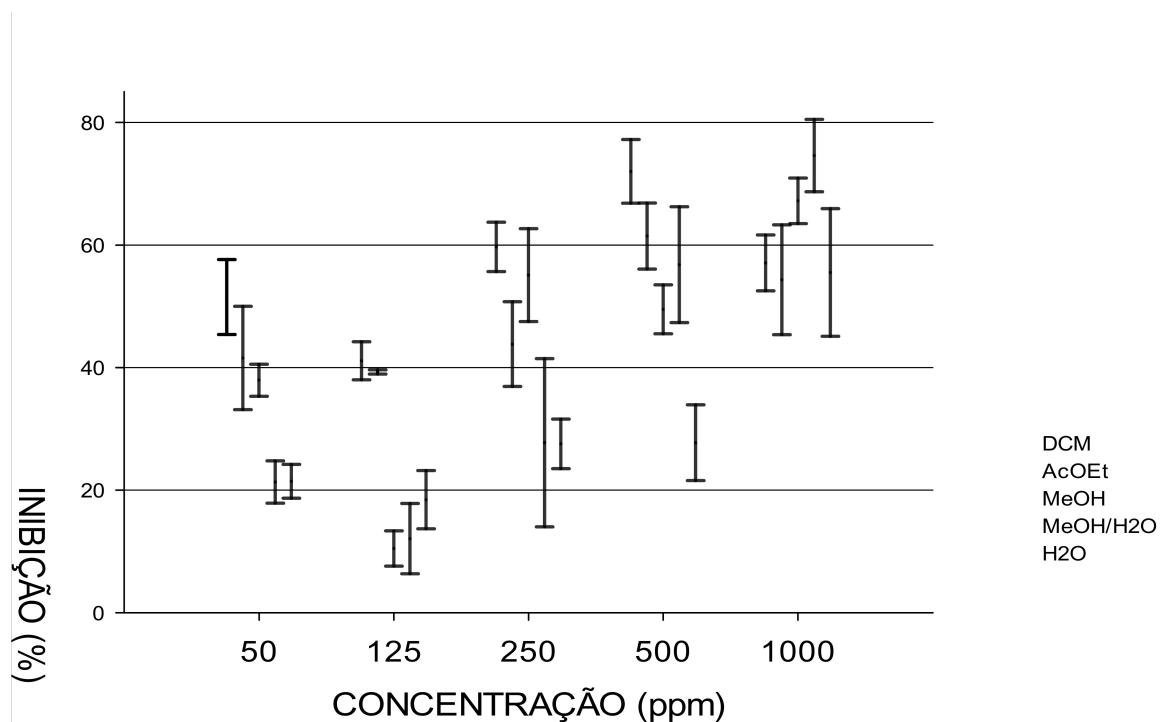


Figura 25: Inibição no crescimento de radícula de sementes de cebola sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Pela análise de variância, a interação entre os fatores não foi significativa ($p>0,05$) para os hipocótilos. Na Tabela 8 estão representados os resultados do Teste de Tukey sobre as médias de comprimento de hipocótilos de cebola. Foi observada diferença significativa entre as médias dos tratamentos com o extrato AcOEt e o tratamento com os extratos DCM e MeOH. As demais médias não diferiram entre si. Para o emprego de diferentes concentrações dos extratos, foram observadas médias significativamente diferentes, sendo que os hipocótilos de menor comprimento foram observados para as maiores concentrações, confirmando a tendência apresentada pela porcentagem de inibição

Tabela 8 Comprimento dos hipocótilos de sementes de cebola submetidas á ação dos extratos de *M. urundeuva* a diferentes concentrações.

EXTRATOS	COMPRIMENTO (mm)	CONCENTRAÇÃO(ppm)	COMPRIMENTO (mm)
DCM	4,9 b	1000	4,6 b
AcOEt	6,1 a	500	4,5 b
MeOH	4,7 b	250	5,6 a
MeOH/H ₂ O	5,7 ab	125	6,0 a
H ₂ O	5,5 ab	50	6,3 a
CONTROLE	8,1	CONTROLE	8,1
CV (%)	23,7	CV (%)	23,7

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Já para as radículas de sementes de cebola, a interação entre os fatores foi significativa ($p<0,01$) pela análise de variância, indicando a existência de uma dependência entre os efeitos dos mesmos.

A Tabela 9 mostra que para o extrato H₂O, não houve diferença significativa entre as médias obtidas para as diferentes concentrações empregadas. Para os demais extratos o emprego de diferentes concentrações provocou variação significativa no comprimento das radículas. Nas concentrações de 125 e 50 ppm, não foram observadas diferenças significativas entre as médias de crescimento para os diferentes extratos, ou seja, nessas concentrações, todos os tratamentos apresentaram o mesmo crescimento. Para as demais concentrações, as médias de crescimento dos tratamentos foram significativamente diferentes.

Tabela 9: Comprimento (mm) das radículas de sementes de cebola submetidas à ação dos extratos de *M. urundeuva* diferentes concentrações.

EXTRATOS	CONCENTRAÇÃO (ppm)				
	1000	500	250	125	50
DCM	9,7 abA	8,6 aA	10,7 bA	11,9 bA	10,0 bA
AcOEt	10,8 abAB	9,7 aB	13,5 abAB	14,7 abAB	15,0 abA
MeOH	7,7 abC	10,3 aBC	11,8 bBC	17,2 aA	14,4 abAB
MeOH/H ₂ O	6,8 bB	11,8 aB	18,2 aA	18,9 aA	17,1 aA
H ₂ O	12,3 aA	13,3 aA	17,5 aA	15,4 abA	17,5 aA
CONTROLE	21,6				
CV (%)	22,3				

*Médias seguidas pela mesma letra (colunas - letras minúsculas; linhas - letras maiúsculas) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.4. Avaliação geral do ensaio

Dentre as espécies utilizadas, a cebola foi a que apresentou as menores porcentagens de germinação, com mínima de 23%. A germinação de pepino e sorgo apresentaram pouca variação em relação aos controles, sendo observados estímulos moderados para as duas espécies. Efeitos estimulatórios também foram observados por Vyvyan (2002) sobre a germinação de *Striga asiatica* submetida a tratamento com a sorgoleona em sua forma hidroquinônica.

Para o pepino, as concentrações mais altas dos extratos causaram maior inibição radicular, sendo observada até 50% de inibição, enquanto que nas menores ocorreu inibição maior para o crescimento do hipocótilo, ainda que tenham sido observadas baixas inibições (em torno de 30%).

Já para sorgo e cebola, foram observadas inibições máximas em torno de 50% e 60%, respectivamente. O aumento da concentração dos extratos acarretou aumento na inibição no crescimento tanto da radícula quanto do hipocótilo, com pouca diferença entre a inibição das duas partes. Macias et al. (1999) observou que frações polares do extrato bruto da folha de girassol também apresentaram o mesmo perfil, inibindo com maior intensidade as radículas do que os hipocótilos.

Inibição de 72% no crescimento de radículas de cebola foi observada por Montanari (2010), ao cultivar as sementes em um meio contendo o óleo essencial de *M. urundeuva*, devido à ação de uma mistura complexa contendo como componente principal o monoterpeno δ -3-careno. Nesse mesmo experimento, observou-se uma inibição de aproximadamente 20% para radícula de pepino. Os efeitos inibitórios foram atribuídos a um possível aumento na peroxidação de lipídeos nas radículas

pela ação dos componentes do óleo essencial.

Para as três espécies, os tratamentos com os extratos mais polares apresentaram as maiores porcentagens de inibição. Os tratamentos com o extrato MeOH figuraram dentre as maiores porcentagens de inibição observadas para radículas e hipocótilos de sorgo e cebola. Para o pepino, as maiores porcentagens de inibição foram observadas no tratamento com o extrato H₂O, seguido pelo MeOH/H₂O.

Somente para as radículas, os tratamentos com o extrato MeOH/H₂O também representaram altas porcentagens de inibição. Além disso, em maiores concentrações desse extrato, foram observados os efeitos inibitórios mais intensos para essas duas espécies, o que pode indicar que os compostos presentes no mesmo apresentam maior seletividade para monocotiledôneas (CUSATI et al., 2014).

Os tratamentos com os extratos DCM 50 ppm e AcOEt 50 e 500 ppm provocaram estímulo no crescimento de cebola e pepino. Efeitos estimulatórios a doses baixas são observados para alguns agentes herbicidas, em um fenômeno de dose-resposta já relatado na literatura, conhecido como hormese, que se caracteriza por estimulação a doses baixas e inibição a doses altas (BELZ, PIEPHO, 2012).

Por fim, foi observada uma diminuição nas porcentagens de inibição das sementes de sorgo e pepino em comparação com o ensaio feito com o extrato bruto, o que pode indicar um possível sinergismo entre substâncias presentes no extrato bruto (ELOFF, 2004).

3.6. Fracionamento do extrato MeOH

No fracionamento do extrato em metanol em coluna aberta de SEPHADEXLH-20 foram coletados 87 tubos de ensaio cujos conteúdos foram reunidos de acordo com a similaridade, resultando na obtenção de oito frações (Tabela 10).

Tabela 10: Massas das frações obtidas do fracionamento da amostra MeOH.

Fração	S2.1	S2.2	S2.3	S2.4	S2.5	S2.6	S2.7	S2.8
Massa (g)	0,1	0,2	1,9	0,1	0,6	0,5	0,9	4,7

Na análise por CCD de tais frações, utilizando como revelador a solução metanólica de cloreto férrico 1%, foram observadas manchas de coloração azul-da-

prússia nas frações S2.4, S2.5, S2.7 e S2.8 (Figura 26-A), indicando a presença de compostos fenólicos e polifenólicos nas mesmas. Em outra placa, utilizando como revelador a vanilina, foram observadas algumas manchas (Figura 26-B), principalmente nas frações S2.4 e S2.5. As frações S2.7 e S2.8 apresentaram menor quantidade de manchas em ambos reveladores.

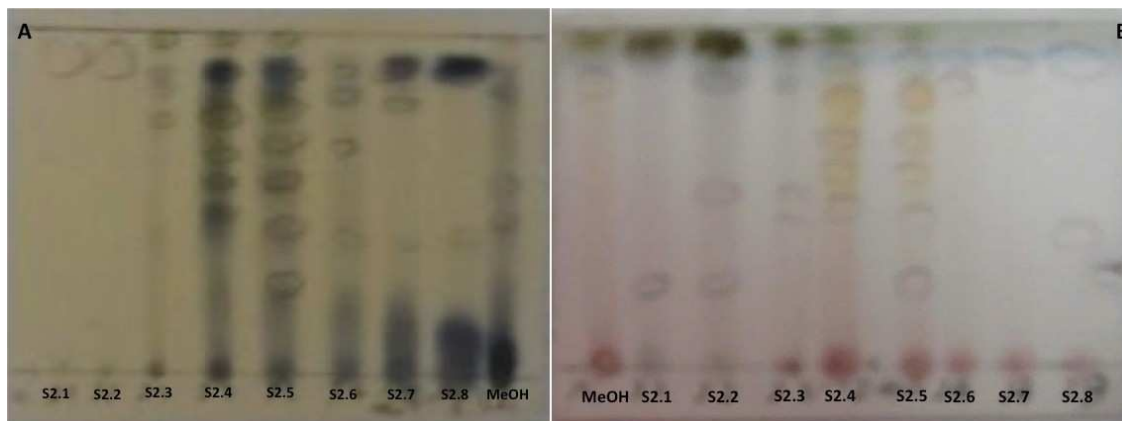


Figura 26: CCD das oito frações obtidas com cromatografia em coluna de SephadexLH-20, utilizando como reveladores (A) Cloreto férrico 1% e (B) Vanilina.

Os espectros no IV das oito frações podem ser observados nas Figuras 27 e 28. A análise do espectro da fração S2.1 (Figura 27-A) mostra que a mesma apresenta uma banda característica de estiramento de grupo hidroxila, estendendo-se de 3000 a 3500 cm^{-1} . O formato da banda sugere a presença de álcoois, pois este tipo de estiramento em grupos hidroxila de ácidos carboxílicos costuma apresentar bandas mais alargadas. A presença de banda em 1071 cm^{-1} pode ser devido a estiramento C-O, fortalecendo a possibilidade da presença de álcoois. O espectro apresenta ainda bandas de estiramento de C-H sp^3 em 2922 e 2853 cm^{-1} e uma banda aguda em 1551 cm^{-1} , que pode corresponder a uma banda de estiramento C=C (BARBOSA, 2007). A ausência de manchas de coloração azul da prússia na placa de CCD revelada com cloreto férrico indica que compostos aromáticos não fazem parte da composição dessa fração (NASCIMENTO, 2008).

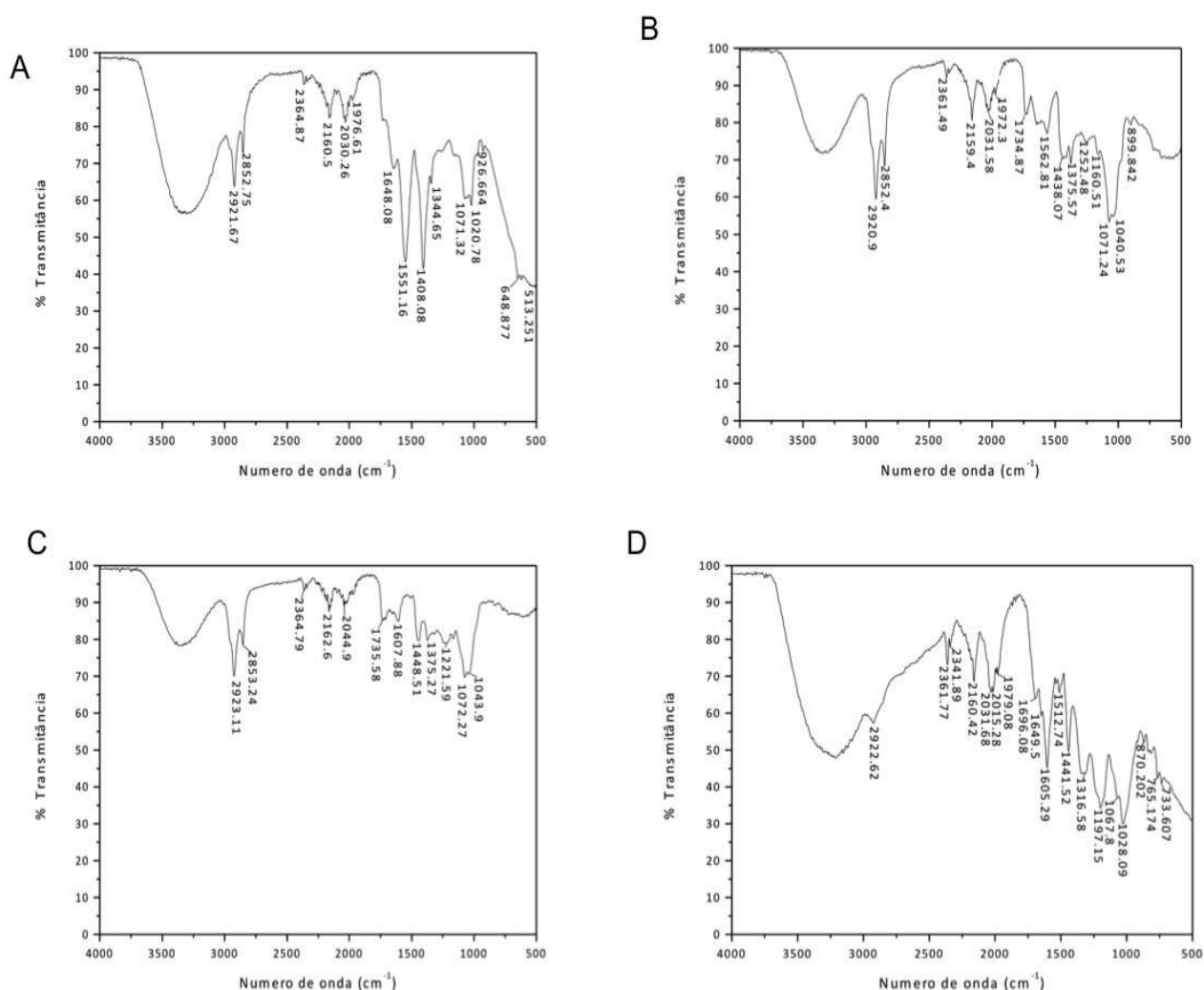


Figura 27: Espectros de IV (ATR) das frações S2.1 (A), S2.2 (B), S2.3 (C) e S2.4 (D)

As frações S2.2 e S2.3 (Figura 27-B e C) apresentaram espectros semelhantes, o que leva a crer que possuem a mesma composição. Ambos possuem bandas de estiramento O-H, possivelmente de álcoois devido ao formato, além de bandas características de estiramento C-H de grupos alquila. A ausência de bandas fortes na região de 1850 a 1610 cm^{-1} é um indício de que as frações não possuem compostos carbonilados.

Os espectros da frações S2.4 (Figura 27-D) e S2.5 (Figura 28-E) também apresentam bandas de estiramento de O-H e não possuem bandas intensas características de compostos aromáticos. Uma banda aguda é observada no espectro de S2.4 em 1605 cm^{-1} , característica de estiramento C=C.

Os espectros de S2.6, S2.7 e S2.8 (Figuras 28-F, G e H, respectivamente) também apresentaram semelhança, sendo observadas bandas referentes ao estiramento C=O e bandas alargadas de estiramento de hidroxilas características de ácidos carboxílicos. Bandas de estiramento C-O na região próxima a 1200 cm^{-1}

também são observadas e podem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos (BARBOSA, 2007)

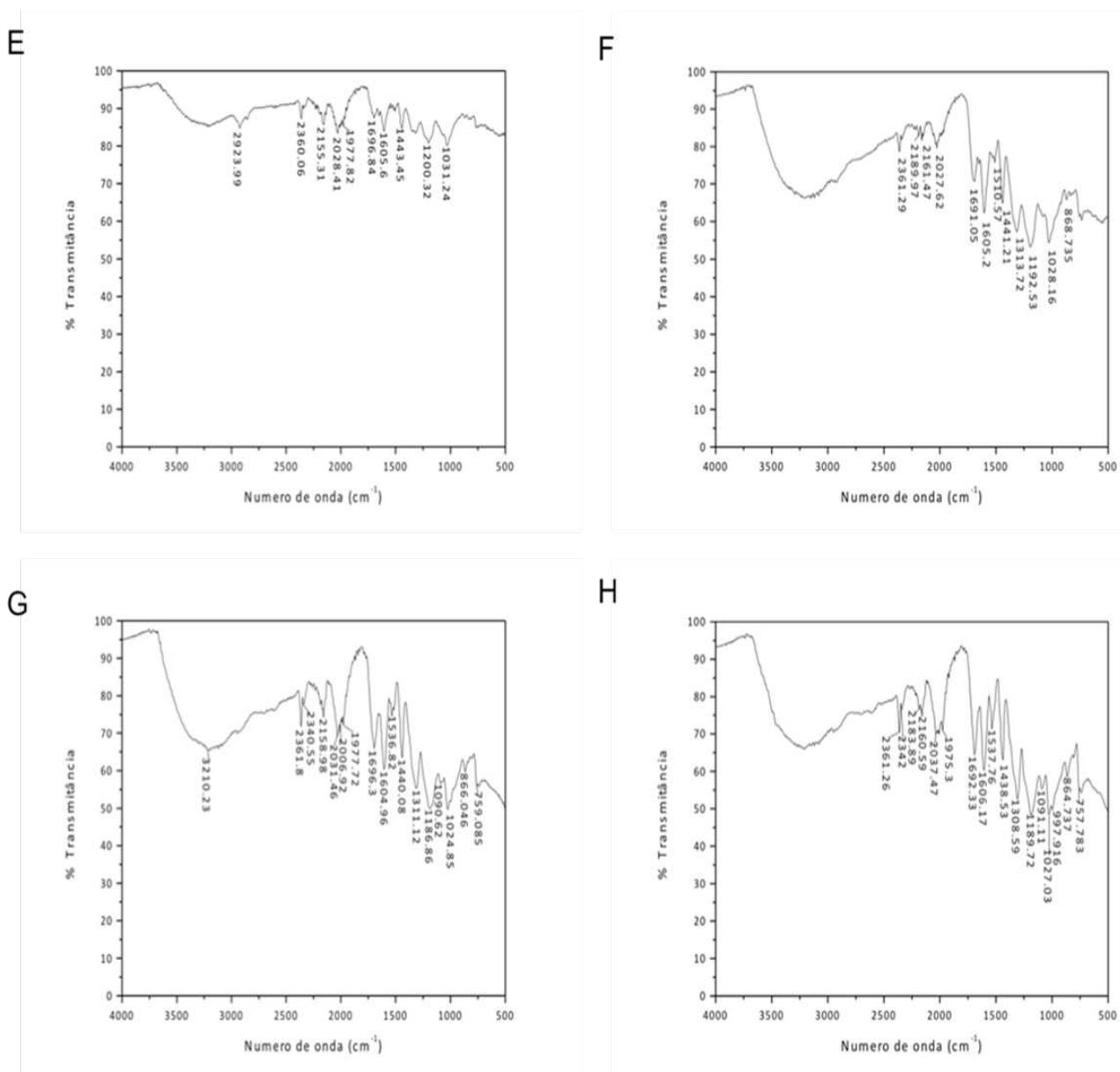


Figura 28: Espectros no IV das frações S2.5 (E), S2.6 (F), S2.7 (G) e S2.8 (H)

3.7. Purificação da fração S2.7 por CLAE

A presença de compostos fenólicos na fração S2.7 foi evidenciada pela CCD revelada com cloreto férrico e pelas bandas no IV. O espectro de UV-visível (Figura 29) apresentou bandas de absorção do sistema benzílico, com máximos nas regiões de 210-220 nm e 260-280 nm. SOUZA (2012) observou bandas nas mesmas regiões para o ácido gálico e galotaninos identificados em folhas de *M. urundeuva*.

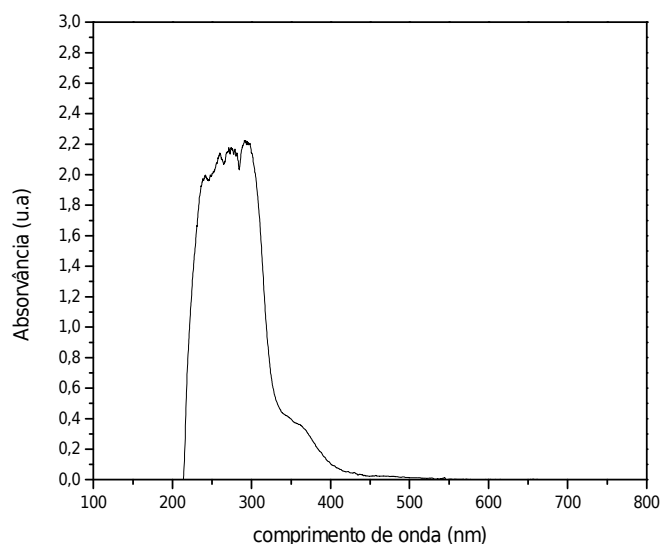


Figura 29: Espectro de UV-visível da fração S2.7

3.7.1. Estudo da fase móvel para purificação da fração S2.7

Primeiramente, a fase móvel utilizada na purificação foi estudada por cromatografia líquida utilizando coluna analítica. Diversas proporções da mistura MeOH:H₂O foram testadas e o eluente com o qual foi obtida a melhor resolução foi MeOH:H₂O 1:4. Um pico bastante intenso é observado no cromatograma (Figura 30) em aproximadamente 12 minutos com boa resolução, apresentando possibilidade de isolamento da substância pura em coluna semi-preparativa.

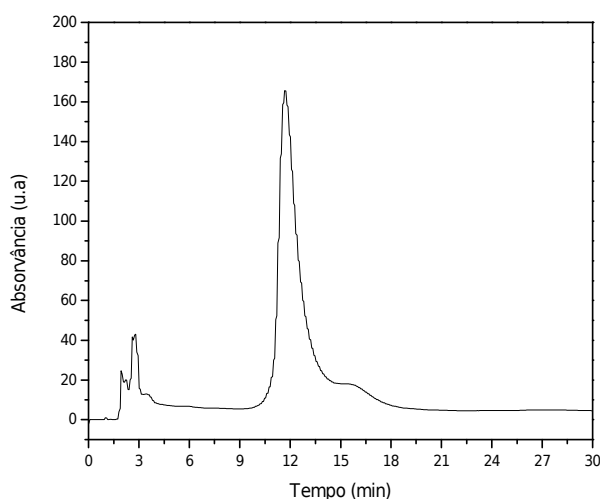


Figura 30: Cromatograma obtido para a fração S2.7 por CLAE analítica

3.7.2. Isolamento do composto T8 por CLAE semi-preparativa

A fração S2.7 foi submetida a purificação adicional por CLAE semi-preparativa, resultando na obtenção de quatro frações denominadas F1 (327,3 mg), F2 (9,5 mg), F3 (2,5 mg) e F4 (0,5 mg). No cromatograma (Figura 31) são observados os picos correspondentes às frações coletadas. As frações F1 e F2 apresentaram os dois picos de maior intensidade do cromatograma em $t_{R1} = 2,2$ e $t_{R2} = 8,0$ minutos, respectivamente.

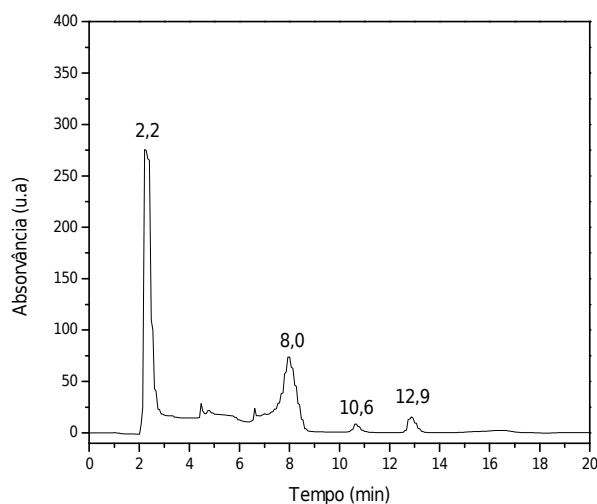


Figura 31: Cromatograma obtido para a fração S2.7 por CLAE semi-preparativa

A purificação da fração F3 por CLAE semi-preparativa resultou no isolamento do composto T8, coletado em $t_R = 8,3$ minutos, apresentando um pico bastante intenso e bem resolvido, como pode ser visto no cromatograma (Figura 32).

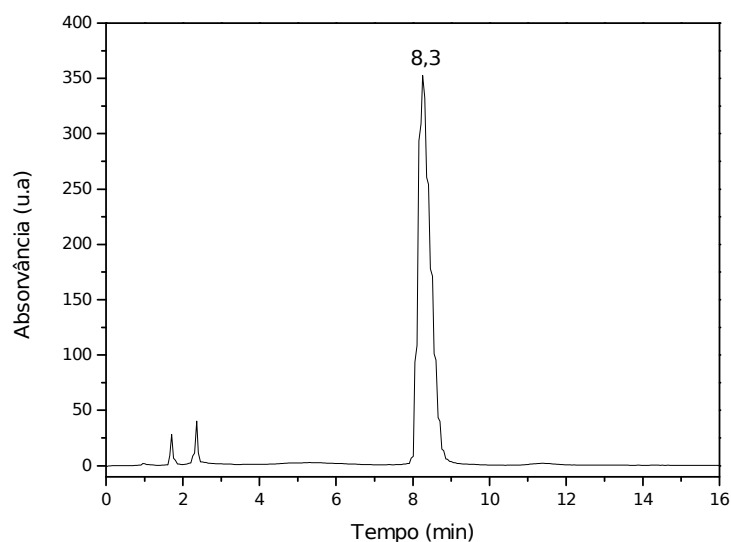


Figura 32: Cromatograma da fração F3 em CLAE semi-preparativa

O composto coletado foi injetado na coluna C18 analítica para confirmação da pureza da amostra, como mostra o cromatograma (Figura 33), no qual observa-se apenas um pico com tempo de retenção de 8,0 minutos.

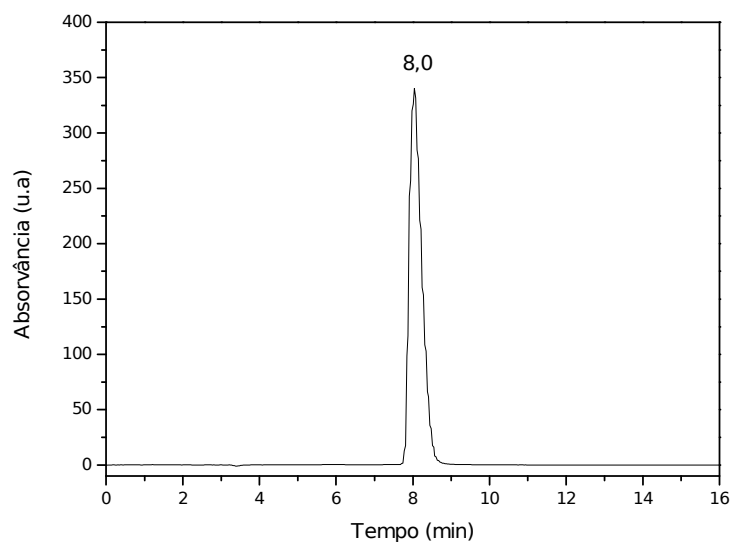


Figura 33: Cromatograma da substância T8 em CLAE analítica

3.7.3. Elucidação estrutural do composto T8

O espectro de massas do composto T8 é apresentado na Figura 34. O pico do íon molecular em m/z 184 e seus fragmentos são compatíveis com a estrutura do galato de metila (3,4,5-triidroxibenzoato de metila). As principais fragmentações são apresentadas na Figura 28. Os picos observados e as fragmentações propostas são compatíveis com os dados encontrados na literatura para o galato de metila (MOURA et al., 2011).

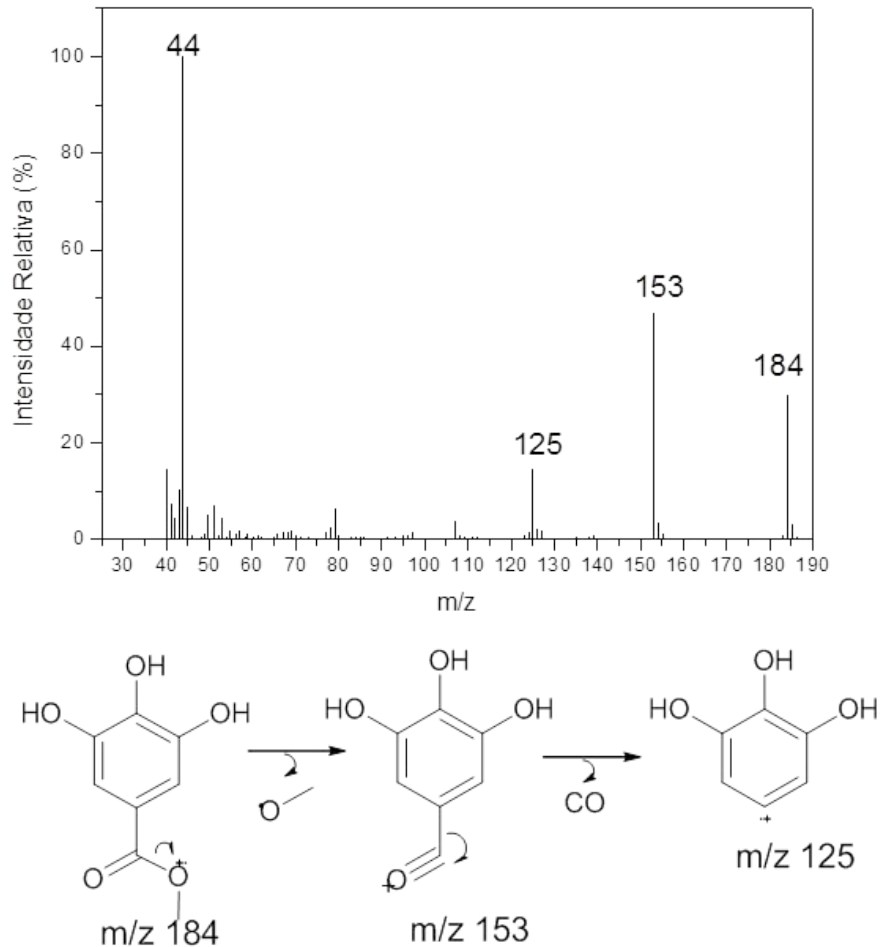


Figura 34: Espectro de massas do composto T8 e principais processos de fragmentação

O espectro de RMN de ^1H (Figura 35) apresenta dois simpletos em $\delta = 3,81$ e $\delta = 7,04$, referentes aos hidrogênios metílicos e aos hidrogênios ligados aos carbonos *orto*, respectivamente. O uso do metanol deuterado implica na presença de sinais para o solvente, uma vez que o mesmo tem capacidade de trocar hidrogênios com os grupos OH do galato de metila (SILVERSTEIN et al., 2005), fazendo com que os sinais dos últimos não sejam observados e sim um simpleto em $\delta = 3,30$ devido aos hidrogênios do solvente. Assim como o metanol, a água também possui a capacidade de troca de hidrogênios e a presença da mesma no solvente gerou um sinal em $\delta = 4,88$ (GOTTLIEB et al., 1997). Os dados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura para o galato de metila (SANTANA et al., 2012).

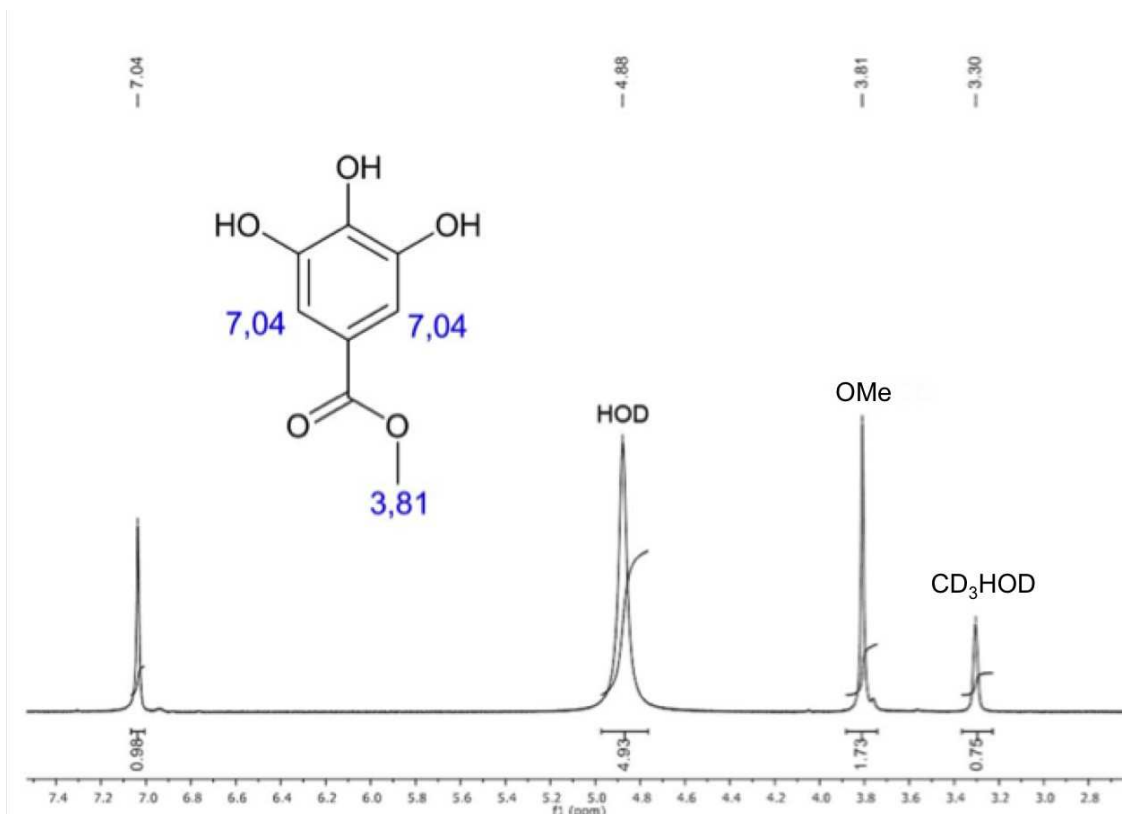


Figura 35: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) do composto T8

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 36), os sinais em $\delta = 138,3$ e $\delta = 145,1$, são referentes aos carbonos nas posições *para* e *meta* do anel aromático, respectivamente. O sinal referente aos carbonos *orto* é observado em $\delta = 108,6$. O carbono ligado à carbonila apresenta sinal em $\delta = 120,0$, enquanto que o sinal da carbonila é observado em $\delta = 167,6$. Por fim, observou-se sinal em $\delta = 50,8$, referente ao carbono metílico. Os dados obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura (SANTANA et al., 2012).

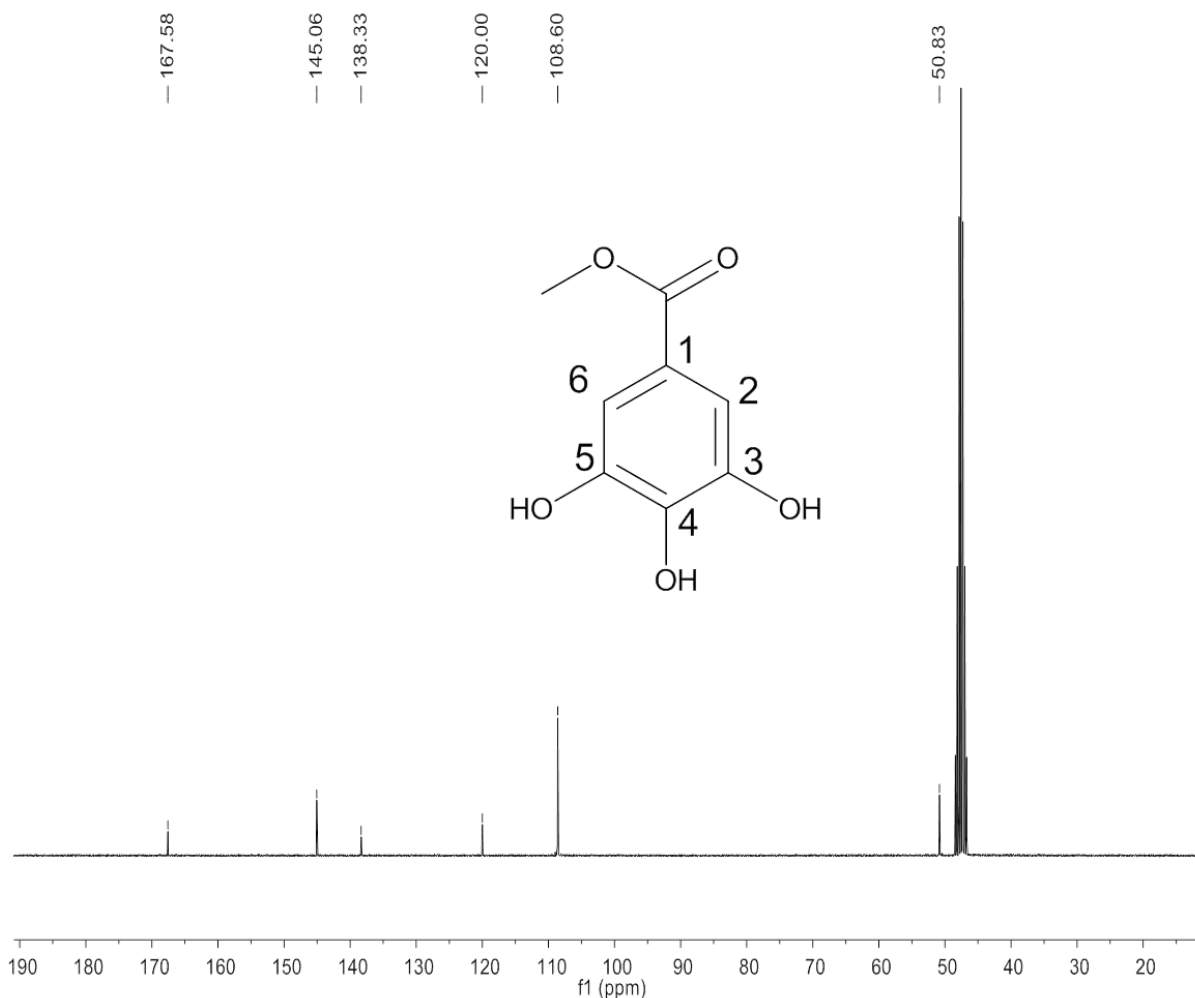


Figura 36: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) do composto T8

Os espectros de massas e RMN forneceram suficiente informação para a caracterização do composto T8 como sendo o galato de metila. Souza (2012) identificou e quantificou tal composto por co-injeção com o padrão, no extrato etanólico de folhas *M.urundeuva*, e afirmou ser o galato de metila o responsável por 20% da massa total do extrato. O galato de metila também foi isolado por Cerukset al. (2007) de *Schinusterebintifolius*, outra espécie da família Anacardiaceae, e apresenta potencial antirradicalar.

3.8. Caracterização da fração S2.8 por CG-MS

A fração S2.8 foi submetida ao processo de derivatização e foi injetada no CG-MS, fornecendo o cromatograma mostrado na Figura 37. Durante a silição, os hidrogênios das hidroxilas livres dos compostos presentes na amostra são substituídos por um grupo trimetilsilil de massa igual a 73 g/mol. Portanto, as massas moleculares dos picos apresentados nos cromatogramas obtidos após essa

derivatização, são adicionadas de tantas unidades de trimetilsilil quantos forem os números de hidroxilas livres presentes nas moléculas.

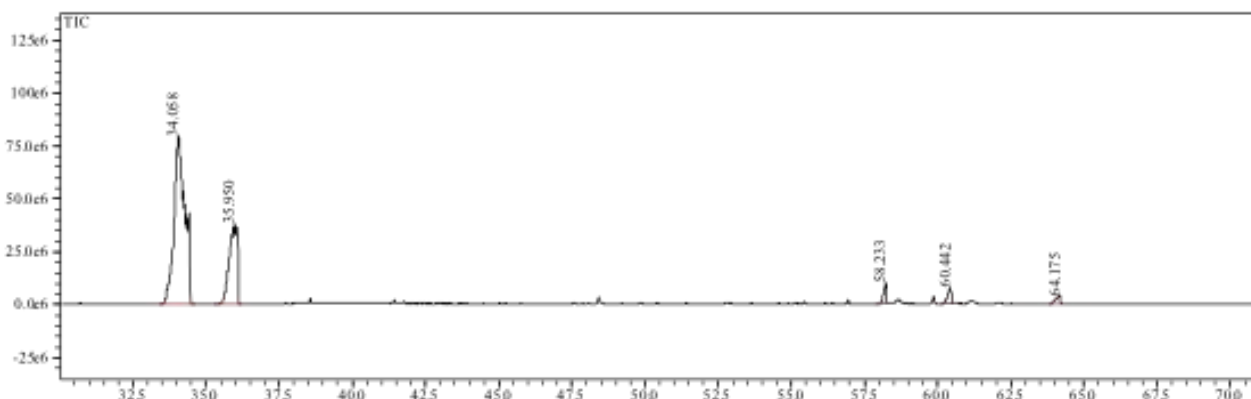


Figura 37: Cromatograma de CG da amostra S2.8 sililada

No cromatograma, são observados cinco picos principais, para os quais foram obtidos os espectros de massas descritos a seguir:

Pico 1 ($t_R = 34,1$ min)

EM, m/z (%): 401 (13)[$M+1^+$]; 400 (38) [M^+]; 281 (100); 73 (83); 45 (56).

Pico 2 ($t_R = 35,9$ min)

EM, m/z (%): 459 (13)[$M+1^+$]; 458 (30) [M^+]; 281 (51); 73 (100); 45 (49).

Pico 3 ($t_R = 58,2$ min)

EM, m/z (%): 370 (30)[$M+1^+$]; 369 (100) [M^+]; 281 (14); 73 (81); 45 (20).

Pico 4 ($t_R = 60,4$ min)

EM, m/z (%): 370 (33)[$M+1^+$]; 369 (100) [M^+]; 281 (14); 73 (50).

Pico 5 ($t_R = 64,2$ min)

EM, m/z (%): 590 (17) [M^+]; 73 (100); 45 (19).

A identificação por meio da comparação com espectros de massa fornecidos pela biblioteca do CG foi possível somente para o segundo pico, com t_R de 35,95 min. O espectro de massas desse pico (Figura 38) é compatível com o composto 3,4,5-tris(trimetilsililoxi)benzoato de trimetilsilila, representado na figura 38,

apresentando 88% de similaridade. O pico base em m/z 73 confirma a fragmentação dos grupos trimetilsilil.

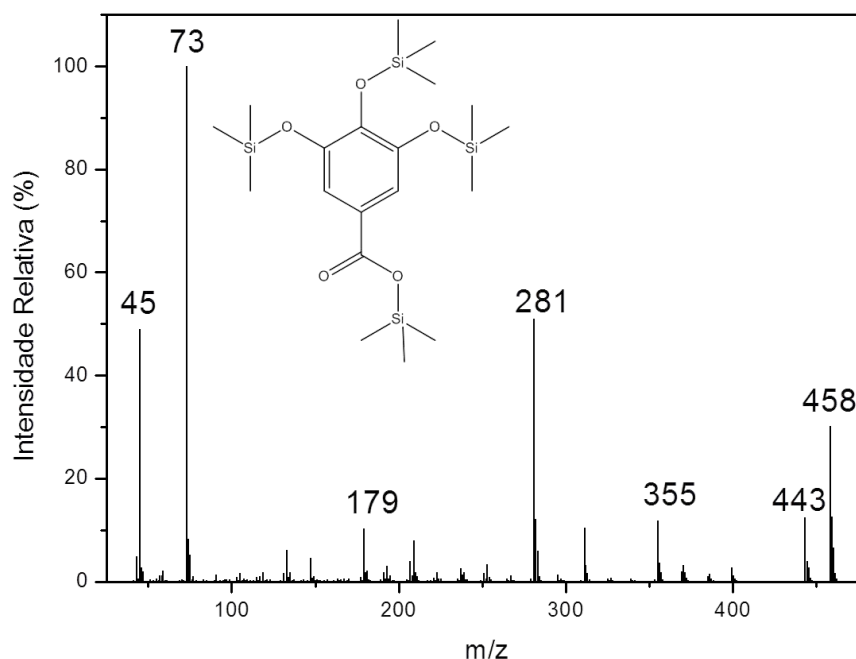


Figura 38: Espectro de massas do segundo pico do cromatograma de CG da fração S2.8

O composto identificado corresponde ao ácido gálico (Figura 39) adicionado de quatro unidades trimetilsilil pelo processo de derivatização. Pelo espectro no IV da fração S2.8, já era esperada a presença de compostos desse tipo.

Figura 39: Estrutura do ácido gálico

Souza (2012) também identificou o ácido gálico no extrato de *M. urundeuva* encontrando um teor de 3,83% do composto no extrato bruto. O composto também foi isolado de *Schinusterebinthifolius* (Anacardiaceae) (CERUKS et al., 2007) e de

diversas espécies de eucalipto, sendo considerado como um dos possíveis responsáveis pelos efeitos alelopáticos das mesmas (FERREIRA, ÁQUILA, 2000).

4. CONCLUSÕES

De maneira geral a germinação não foi fortemente afetada pelos tratamentos com o extrato bruto e com as frações obtidas do mesmo, sendo observadas, inclusive, suaves estímulos, principalmente nos tratamentos com frações mais refinadas.

As folhas de Aroeira coletadas na região de Aimorés-MG apresentaram em sua composição misturas de compostos com atividade fitotóxica, uma vez que o extrato bruto foi capaz de inibir em até 80% o desenvolvimento de sementes de sorgo e pepino. De maneira geral, com a obtenção de frações refinadas, foi observado que as frações mais polares provocaram maior inibição sobre o crescimento de sementes de pepino, sorgo e cebola em relação às menos polares. Além disso, há indícios de que possa ocorrer sinergismo entre diferentes compostos, uma vez que foi observada uma leve redução na atividade fitotóxica, principalmente nos tratamentos com os extratos mais refinados.

Dentre todos, a fração metanólica apresentou as maiores inibições no crescimento das três sementes. As frações metanol/água e água também provocaram fortes inibições, contudo este comportamento não foi observado para todas as sementes. A purificação da fração em metanol forneceu frações ricas em compostos fenólicos, nas quais foram encontrados o ácido gálico e o galato de metila, sendo este último isolado por CLAE semi-preparativa e caracterizado por técnicas espectroscópicas.

A influência do extrato bruto nos ensaios biológicos sugere que as folhas de aroeira podem atuar como fontes de aleloquímicos em possíveis interações alelopáticas, que podem ser responsáveis pela predominância de *M. urundeuva* em algumas regiões do médio Rio Doce-MG. A investigação de tal atividade deve seguir pela identificação de outros compostos presentes nas frações purificadas, além de ensaios de alelopatia realizados nas condições do ambiente natural.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, E.S.; BARBOSA, L.C.; SALIBA, W.A.; ARANTES, F.F.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A. Synthesis and evaluation of the phytotoxic activity of α -Santonin derivatives. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 401-406, 2009.

BANDEIRA, M.A.M; MATOS, F.J.A; BRAZ-FILHO, R. Structural Elucidation and total assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of new chalcone dimers. **Magnetic Resonance Chemistry**, vol. 41 n. 12, p. 1009-1014, 2003.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa: ed. UFV, 2007.

BARBOSA, L.C.A; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus molle* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007

BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, M.L.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A.; PEREIRA, R.C. Preparation and phytotoxicity of sorgoleone analogues. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 751-755, 2001.

BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, V.L.; OLIVEIRA, F.M.; BORGES, E.E.L. Fitotoxicidade de novos álcoois e alquenos derivados do 2 α ,4 α -dimetil-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-ona. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, p. 33-41, 2005.

BEGOSSI, A., HANAZAKI, N.; TAMASHIRO, J.I. 2002. Medicinal Plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge, Use, and Conservation. **Human Ecology**. v.30, n.3, p.281-299.

BELINELO, V.J.; CZEPAK, M.P.; FILHO, S.A.V.; MENEZES, L.F.T.; JAMAL, C.M. Alelopatia de *Arctium minus* BERNH (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 12-16, 2008.

BELZ, R.G.; PIEPHO, H.P. Variability of hormetic dose responses of the auxin PCIB on *Lactuca sativa* in a plant bioassay. **Weed Research**, v. 53, p. 418-428, 2013.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. p. 203-272.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, no 3, p. 697-705, 2007.

CBD, 2010. **Convention on Biological Diversity**. Organização das Nações Unidas. <https://www.cbd.int/convention/text/>. Acesso em 15 jul 2015.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus molle* RADDI (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, no 3, 597-599, 2007.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

CUSATI, R.C.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; DEMUNER, A.J.; BASTIDAS, A.O.; SILVA, A.A. Tetraoxanes as a new class of efficient herbicides comparable with commercial products. **Pest Management Science**, v. 71, p. 1037-1048, 2014.

DE BESSA, N.G.F.de; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S., CHAGAS JUNIOR, A.F., ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde-tocantins. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

ELLOF, J.N. Quantification the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation. **Phytomedicine**, v. 11, p. 370-371, 2004.

EINHELLIG, F.A. An Integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press, 1999. p. 479-494.

FERREIRA, A. G. Interferência: Competição e Alelopatia. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 2004. p. 251-262.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

GABRIEL, A.J.A.; LIMA, M.E.F.; SOUZA, M.A.A.; SOUZA, S.R. Germinação de sementes de alface e de duas ervas invasoras com a aplicação de um novo análogo do estrigol, sintetizado a partir do safrol. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 544-546, 2002.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GNIAZDOWSKA, A. BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 27, n. 3B, p. 395-407, 2005.

GOTTLIEB, H.E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts os common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HART, T. B., HART, J. A. & MURPHY, P. G. Monodominant and species-rich forests of the humid tropics: causes for their co-occurrence. **The American Naturalist**, n.133, v.5, p. 613-633, 1989.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HASLAM, E. **Plant polyphenols: vegetable tannins revisited**. Cambridge: University Press, 1989.

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 186-202, 1996.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Myracrodruonurundeuvafr.allemão* (anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, vol. 5, n. 3, p. 193-206, 2002.

MACHADO, A.C. **Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruonurundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2013.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; GALINDO, J.C.G.; VARELA, R.M.; SIMONET, A.M.; CASTELLANO, D. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. **Journal of Crop Production**, v.4, n. 2, p. 237-255, 2001.

MACÍAS, F.A.; OLIVA, R.M.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. **Phytochemistry**, v. 52, p. 613-621, 1999.

MARÍN-LOAIZA, J. C.; ERNST, L.; BEUERLE, T.; THEURING, C.; CÉSPEDES, C. L.; HARTMANN, T. Pyrrolizidine alkaloids of the endemic mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. **Phytochemistry**, v.69, p. 154–167, 2008.

MONTANARI, R.M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Agroquímica)- Univesidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MONTANARI, R.M.; BARBOSA, L.C.A, DEMUNER, A.J; SILVA, C.J; ANDRADE, N.J; ISMAIL, F.M.D; BARBOSA, M.C.A. Exposure to anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation with in food-borne bacterial cells. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9728-9740, 2012.

MOURA, A.C.S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NASCIMENTO, A.M. **Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**. 2008. 159 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

OLIVEIRA, F.P.; FILHO, E.I.F.; SOARES, V.P.; SOUZA, A.L. Mapeamento de fragmentos florestais com monodominância de aroeira a partir da classificação supervisionada de imagens rapideye. **Revista Árvore**, vol. 37, p. 151-161, 2013.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruonurundeuva*). **RevistaÁrvore**, vol. 26, p. 493-497, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathicresearch in Brasil.**ActaBotanicaBrasilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; González, L. Ecophysiological approach in allelopathy.**Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 577-608,1999.

SANTANA, J.S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G.; MATSUO, A.L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinusterebinthifolius*Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2245-2248, 2012.

SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G. **Methods in polyphenol analysis**.Cambridge: ed. Athenaeum Press, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**.John Wiley& Sons, 2005.

SOUZA,L.P. **Padronização de extratos vegetais: *Astroniumurundeuva* (Anacardiaceae)**. 2012 Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012.

SOUZA, M.A.A.; SILVA, A.R.; FERREIRA, M.A.; LEMOS, M.J.; RAMOS, R.G.; FERREIRA, A.B.B.; SOUZA, S.R. Atividde biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimentofúngico e em germinação de sementes. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 1670-1671, 2008.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 351-355, 2007.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vacciniumashei*)e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 59-64, 2009.

STICHER, O. Natural product isolation.**Natural Product Reports**, v. 25, p. 517-554, 2008.

VALENTE, E. L. **Caracterização da intensidade de degradação do solo e da cobertura vegetal de uma área no médio Rio Doce, utilizando imagens IKONOS II**. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

VIECELLI, C.A.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 39-46, 2009.

VIANA, G.S.B; BANDEIRA, M.A.M; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, vol. 10, n. 2, p. 189-195, 2003.

VIANA, G.S.B; BANDEIRA, M.A.M; SOUZA-FILHO, M.V.P; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* fr. all. **Phytotherapy Research**, vol. 11, n. 2, p. 118-122, 1997.

VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current opinion in plant biology**, v. 7, p. 472-479, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Porcentagem de germinação (média \pm desvio-padrão) de sementes de sorgo sujeitas a tratamento com o extrato bruto de *M. urundeuva* diferentes concentrações

GERMINAÇÃO (%)		
Concentração (ppm)	SORGO	PEPINO
CONTROLE	77 \pm 3	100 \pm 0
1000	53 \pm 6	100 \pm 0
500	80 \pm 10	100 \pm 0
250	67 \pm 10	100 \pm 0
125	77 \pm 8	100 \pm 0
50	67 \pm 10	100 \pm 0

APÊNDICE B - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de hipocótilo e radícula de sementes de sorgo e pepino sujeitas ao ensaio com o extrato bruto de *M. urundeuva*

INIBIÇÃO (%)				
Concentração (ppm)	PEPINO		SORGO	
	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula
50	61,8 \pm 1,3	82,4 \pm 6,8	30,0 \pm 8,5	49,6 \pm 8,1
125	64,8 \pm 2,0	67,8 \pm 6,3	39,2 \pm 5,1	69,3 \pm 5,0
250	63,2 \pm 2,4	76,9 \pm 1,8	27,3 \pm 2,0	57,4 \pm 6,3
500	58,8 \pm 4,1	59,4 \pm 2,3	32,8 \pm 1,4	68,1 \pm 2,1
1000	43,8 \pm 10,7	35,7 \pm 5,6	50,7 \pm 4,8	70,9 \pm 1,6

APÊNDICE C - Porcentagem de germinação (média \pm desvio-padrão) de sementes de pepino sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

GERMINAÇÃO (%)					
Concentração (ppm)	DCM	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O	H ₂ O
50	83 \pm 6	85 \pm 7	93 \pm 6	84 \pm 5	90 \pm 7
125	81 \pm 5	83 \pm 10	83 \pm 5	94 \pm 6	89 \pm 6
250	81 \pm 8	84 \pm 8	85 \pm 6	95 \pm 7	90 \pm 4
500	86 \pm 8	81 \pm 3	89 \pm 3	83 \pm 6	96 \pm 8
1000	89 \pm 5	85 \pm 7	83 \pm 9	81 \pm 8	83 \pm 14
CONTROLE	78 \pm 10				

APÊNDICE D - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de hipocótilo de sementes de pepino sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO* (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	-1,4 \pm 3,7	23,2 \pm 6,0	23,9 \pm 2,6	19,3 \pm 5,3	25,7 \pm 6,8
125	8,2 \pm 0,8	12,5 \pm 6,4	21,3 \pm 4,2	11,1 \pm 4,9	33,3 \pm 4,6
250	8,3 \pm 6,7	14,9 \pm 3,5	16,1 \pm 2,6	17,9 \pm 0,3	26,0 \pm 4,5
500	15,8 \pm 2,1	14,8 \pm 5,1	19,7 \pm 1,8	20,3 \pm 2,1	38,5 \pm 2,2
1000	11,5 \pm 8,6	2,8 \pm 1,0	8,6 \pm 3,8	27,5 \pm 2,5	27,0 \pm 2,9

* Valores positivos indicam inibição e valores negativos indicam estímulo

APÊNDICE E - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de radícula de sementes de pepino sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO* (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	-5,8 \pm 6,1	11,1 \pm 5,8	14,8 \pm 5,4	5,1 \pm 4,3	19,1 \pm 2,6
125	13,5 \pm 7,9	23,5 \pm 4,7	1,0 \pm 3,1	25,8 \pm 4,9	27,4 \pm 2,8
250	5,8 \pm 3,9	8,8 \pm 4,1	19,0 \pm 3,1	43,4 \pm 5,8	27,6 \pm 3,0
500	15,7 \pm 1,2	-4,3 \pm 2,3	13,5 \pm 3,6	25,6 \pm 3,3	34,4 \pm 8,0
1000	50,4 \pm 4,2	3,5 \pm 1,3	10,4 \pm 2,6	47,2 \pm 2,9	50,2 \pm 0,9

* Valores positivos indicam inibição e valores negativos indicam estímulo

APÊNDICE F - Porcentagem de germinação de sementes de sorgo sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	GERMINAÇÃO (%)				
	DCM	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O	H ₂ O
50	70 \pm 4	60 \pm 4	65 \pm 4	55 \pm 4	68 \pm 3
125	59 \pm 6	60 \pm 15	66 \pm 3	68 \pm 5	53 \pm 15
250	60 \pm 9	51 \pm 9	51 \pm 13	60 \pm 15	66 \pm 14
500	59 \pm 8	56 \pm 9	63 \pm 9	41 \pm 9	58 \pm 6
1000	61 \pm 8	65 \pm 7	58 \pm 6	50 \pm 7	58 \pm 9
CONTROLE	49 \pm 5				

APÊNDICE G - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de hipocótilo de sementes de sorgo sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	28,8 \pm 10,2	43,8 \pm 9,2	21,4 \pm 17,3	23,7 \pm 2,4	25,5 \pm 4,2
125	26,4 \pm 16,4	44,6 \pm 2,1	12,8 \pm 8,7	43,5 \pm 1,6	33,9 \pm 4,1
250	33,6 \pm 9,0	42,0 \pm 2,0	21,3 \pm 2,9	29,7 \pm 5,3	27,4 \pm 1,5
500	24,0 \pm 12,8	43,2 \pm 0,8	47,8 \pm 2,5	21,2 \pm 2,9	35,9 \pm 1,4
1000	47,2 \pm 12,2	51,1 \pm 5,8	49,1 \pm 2,5	34,9 \pm 4,9	47,3 \pm 3,2

APÊNDICE H - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de radícula de sementes de sorgo sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	13,3 \pm 12,7	18,7 \pm 13,8	29,3 \pm 2,2	21,0 \pm 1,5	30,8 \pm 8,4
125	16,7 \pm 5,1	35,2 \pm 3,2	21,7 \pm 3,8	30,2 \pm 4,6	18,7 \pm 2,0
250	19,0 \pm 7,9	29,3 \pm 7,0	17,8 \pm 5,6	20,1 \pm 9,3	23,2 \pm 10,1
500	22,2 \pm 3,6	36,1 \pm 7,4	39,4 \pm 9,5	36,2 \pm 8,0	46,0 \pm 1,8
1000	27,8 \pm 2,2	45,9 \pm 8,0	46,0 \pm 3,9	48,0 \pm 10,2	37,1 \pm 3,2

APÊNDICE I - Porcentagem de germinação (média \pm desvio-padrão) de sementes de cebola sujeitas a tratamento com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	GERMINAÇÃO (%)				
	DCM	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O	H ₂ O
50	44 \pm 5	65 \pm 9	54 \pm 5	61 \pm 3	37 \pm 3
125	23 \pm 3	55 \pm 4	60 \pm 12	61 \pm 5	50 \pm 4
250	60 \pm #	55 \pm 5	70 \pm 5	58 \pm 6	48 \pm 3
500	25 \pm 5	50 \pm 4	50 \pm 8	45 \pm 7	53 \pm 9
1000	45 \pm 7	31 \pm 9	62 \pm 8	48 \pm 8	30 \pm 5
CONTROLE	71 \pm 8				

APÊNDICE J - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) de hipocótilo de sementes de cebola sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO* (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	25,3 \pm 2,3	-16,4 \pm 6,0	34,6 \pm 5,4	28,4 \pm 7,8	35,1 \pm 9,2
125	39,7 \pm 6,2	23,5 \pm 2,0	32,9 \pm 12,5	29,8 \pm 5,0	37,6 \pm 8,2
250	45,9 \pm 6,3	32,0 \pm 5,2	49,1 \pm 4,1	28,6 \pm 9,2	35,8 \pm 8,2
500	61,0 \pm 6,6	38,4 \pm 3,9	52,2 \pm 6,4	46,4 \pm 5,2	29,5 \pm 5,3
1000	52,3 \pm 5,4	54,4 \pm 8,8	62,6 \pm 5,9	58,0 \pm 6,6	36,0 \pm 7,0

* Valores positivos indicam inibição e valores negativos indicam estímulo

APÊNDICE K - Inibição no crescimento (média \pm desvio-padrão) radícula de sementes de cebola sujeitas aos tratamentos com as frações do extrato de *M. urundeuva* diferentes concentrações

Concentração (ppm)	INIBIÇÃO (%)				
	DCM	ACOET	MEOH	MEOH_H ₂ O	H ₂ O
50	51,5 \pm 6,1	41,6 \pm 8,4	37,9 \pm 2,6	21,3 \pm 3,5	21,4 \pm 2,8
125	41,1 \pm 3,1	39,3 \pm 0,3	10,5 \pm 2,9	12,1 \pm 5,7	18,4 \pm 4,8
250	59,7 \pm 4,0	43,8 \pm 6,9	55,1 \pm 7,6	27,7 \pm 13,7	27,5 \pm 4,0
500	72,0 \pm 5,2	61,5 \pm 5,4	49,5 \pm 4,0	56,8 \pm 9,5	27,7 \pm 6,2
1000	57,1 \pm 4,6	54,3 \pm 9,0	67,2 \pm 3,7	74,6 \pm 5,9	55,5 \pm 10,4