

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES
DO CERRADO**

ANA BEATRIZ GATTI

São Carlos - S.P.
Brasil
2008

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DO CERRADO

ANA BEATRIZ GATTI

**Tese apresentada ao Centro de Ciências Biológicas
e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor junto ao Programa de Pós-graduação em
Ecologia e Recursos Naturais.**

**São Carlos - S.P.
Brasil
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G263aa

Gatti, Ana Beatriz.

Atividade alelopática de espécies do cerrado / Ana Beatriz Gatti. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
136 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Botânica. 2. Alelopatia. 3. Esteróides. 4. Aristolochia. 5. Compostos químicos. 6. Interação planta-planta. I. Título.

CDD: 581 (20^a)


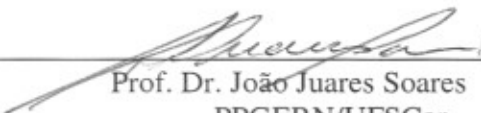
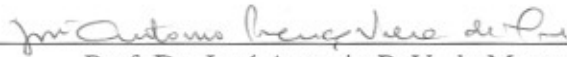


Ana Beatriz Gatti

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DO CERRADO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 28 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

- Presidente 
Prof. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima
(Representante da Orientadora)
- 1º Examinador 
Prof. Dr. João Juarez Soares
PPGERN/UFSCar
- 2º Examinador 
Prof. Dr. José Antonio P. V. de Moraes
FAFICA/Catanduiva-SP
- 3º Examinador 
Prof. Dr. Alfredo Gui Ferreira
UFRGS/Porto Alegre-RS
- 4º Examinador 
Prof. Dra. Débora Yara Alves Cursino dos Santos
USP/SÃO PAULO-SP

ORIENTADORA:

PROF^a. DR^a SONIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI DE ANDRADE PEREZ

CO-ORIENTADOR:

PROF^o. DR^o ALFREDO GUI FERREIRA

Amar o perdido
deixa confundido
este coração

Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão

Mas as coisas findas
muito mais do que lindas,
essas ficarão.

(Memória -
Carlos Drummond de Andrade).

"Dedico este trabalho aos meus pais Maria Helena e Alecio, por todo amor e apoio e que sempre me ensinaram e incentivaram a estudar e trabalhar honestamente.
Aos meus irmãos Denise e Marco por todo amor e compreensão.

Ao Rodrigo por todo carinho e felicidade de estarmos juntos"

AGRADECIMENTOS

Agradeço à contribuição valiosa de muitos que ajudaram a tornar possível este trabalho:

À Prof^a Sonia Cristina J.G. de A. Perez pelo prazer de termos trabalhado juntas, agradeço pela orientação, pela atenção e carinho, pelas conversas, compreensão e alegria sempre.

Ao Prof^o Alfredo Gui Ferreira por sua orientação, pela oportunidade, por todos seus ensinamentos (de trabalho e de vida, dos quais sempre me lembrarei) e pelo carinho e atenção dedicados a mim, mesmo às vezes estando longe e, principalmente por vir de tão longe tantas vezes pra me acompanhar.

À Prof^a Maria Ines Salgueiro Lima pela amizade sincera e carinho de sempre, pela paciência em sempre me atender, por seus ensinamentos sempre, suas ótimas conversas sempre e por assumir tão prontamente este trabalho, e além de tudo por me incentivar agora nessa fase final.

...enfim aos meus "três" orientadores, pelos quais tenho enorme admiração e sinto muita alegria e orgulho de termos trabalhados juntos, obrigada sempre!

Aos meus pais, Maria Helena e Alecio pela minha formação pessoal, por serem pessoas tão maravilhosas que sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos, pelo amor tão grande e os cuidados carinhosos. A eles, que amo demais, que me ensinam sempre os valores de amor, compreensão, sinceridade e honestidade. Aos meus irmãos Denise e Marco Aurélio por estarem sempre ao meu lado me apoiando com amor e alegria, obrigada pelos momentos e conhecimentos compartilhados, pessoas com as quais aprendo muito sempre e que amo demais. À Paula, à Letícia, à Isabela e à Vó Carminha pelo enorme carinho, por sempre me ajudarem, pelos momentos felizes; em especial à Le e Isa pela inocência e alegria tão sincera que sempre nós traz alegria.

Ao Rodrigo por todo o carinho e amor tão especial, pelo sorriso sempre e pela ajuda neste trabalho e em todos os momentos da vida, obrigada por me ajudar a crescer, participar e me incentivar, pelo amor, cuidado e principalmente pelos momentos felizes de todos estes anos. Esse rapaz de "Coração Civil" que amo muito, que me ensina e apóia sempre.

Aos queridos: Roberto, Suzana, Carol e Danilo pelos cuidados mesmo de longe, por todo amor e incentivo e principalmente por compreenderem a 'nossa' ausência em muitos momentos.

Ao doutorando Djalma e Lia (Depto Química) pela ajuda na realização das análises químicas, por todo o seu cuidado e atenção em ensinar as técnicas de cromatografia e os "ensinamentos químicos". Ao Prof. Paulo César Vieira (Depto Química) pela oportunidade e uso do laboratório de Produtos Naturais. Aos professores do Depto de Botânica: Marco Batalha e João Juarez Soares

pela ajuda na identificação das espécies e pela atenção; ao Prof. Marcos Arduim pela orientação, atenção e disponibilização do laboratório de Anatomia.

Aos Professores Dr. Francisco Antonio Macías Dominguéz, José Maria Gonzalez Molinillo e a Prof^a. Rosa Maria Varela Montoya por me receberem tão bem, e pela enorme (grande mesmo) paciência em entender meu *portunhol*, e por tudo que aprendi. Aos alunos do Depto de Alelopatia Cefe, Nuria, Helena e em especial a Loly por sua ajuda e simpatia.

À Sarah e Carlos, por me ajudarem no laboratório e me receber tão bem. A Sarah por seu enorme coração, e por ser essa pessoa com uma palavra amiga e sorriso a todo o momento, por suas brincadeiras, por sua ajuda imprescindível e companhia constante.

Ao Warley pela acolhida em terras tão longe, pela atenção e principalmente pela confiança. Aourell pelo enorme carinho, momentos tão especiais que passamos juntas e por me ensinar tantas coisas.

Agradeço a todos as amigas especiais que conheci nesses anos: Rosangela, Luiza, Maristela, Letícia, Glaucia, Silmara, Priscila, Gisele (*in memoria*), Márcia, Irene e Bernardete pelo carinho e pelas conversas, pela amizade tão sincera e atenção sempre. Por todos os momentos de descontração, de cumplicidade e aprendizado, risadas e convivência que extrapolaram a convivência da Universidade, pela amizade sincera que levamos mesmo depois de nossos estudos.

A todos os amigos do laboratório de Botânica: Fernando, Marcos, Aluisio, Alessandro, Marcão, Igor, Regis, Carlão, João, Eugênio, etc ... pelo carinho e amizade.

Aos amigos: Maristela e Spin, Karina e Bicudo, Ana e Velinho pela amizade tão forte, pelas conversas, encontros tão agradáveis e carinho de sempre.

Aos técnicos Casali, Ademir, S. Luis e Maristela do Depto de Botânica e ao Zé Roberto (Depto de Fisiologia) pelo apoio durante o desenvolvimento do todo o trabalho, por nos ajudarem e ensinarem sempre com grande satisfação e alegria. À Inês e à Ofélia pelas tardes agradáveis e pelos cafés pra nos manter acordado depois do almoço!!! Ao Marco Bertini pela colaboração, ajuda, amizade, pelas brincadeiras e risadas.

Aos participantes do exame de qualificação (Alfredo Gui Ferreira, Maria Ines Salgueiro Lima e José Antonio P.V. de Moraes) por colaborarem prestativamente na correção de parte deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa - CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim sou imensamente grata à minha família e amigos que torceram por mim e que proporcionaram maravilhosos e necessários momentos de descontração.

Sumário

INTRODUÇÃO	9
Referências bibliográficas	21
Capítulo I	
“EFEITO DA SAZONALIDADE NA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE FOLHAS DE ONZE ESPÉCIES COLETADAS EM ÁREA DE CERRADO”	28
Introdução	29
Material e métodos	31
Resultados e Discussão	39
Conclusões	54
Referências Bibliográficas	55
Capítulo II	
“ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>ARISTOLOCHIA ESPERANZAE</i> O.KUNTZE SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES, O CRESCIMENTO DE RAIZ E DE SUAS CÉLULAS XILEMÁTICAS EM PLÂNTULAS DE <i>SESAMUM INDICUM</i> L. “	59
Introdução	61
Material e métodos	64
Resultados e discussão	69
Conclusões	83
Referências Bibliográficas	84
Capítulo III	
“COMPOSTOS BIOATIVOS DE RAÍZES DE <i>ARISTOLOCHIA ESPERANZAE</i> O. KUNTZE”	90
Introdução	91
Materiais e método	93
Resultados e discussão	99
Conclusões	119
Referências bibliográficas	120
Conclusões gerais	125

Abreviaturas e Símbolos utilizados

CCD - Cromatografia de Camada Delgada.

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC - High-performance Liquid Chromatography

mOsm/Kg - unidade de concentração osmótica - (miliosmol).

PEG-6000 - Polietilenoglicol, com peso molecular de 6000.

RMN-H¹ - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

INTRODUÇÃO

O domínio do Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área de 204,7 milhões de hectares na porção central do Brasil, sendo superado em área apenas pela Amazônia (Klink e Machado, 2005).

Modernamente, o Cerrado é considerado como uma savana, com grande variação fisionômica, indo de uma fisionomia campestre (campo limpo) a uma florestal (cerradão), passando pela fisionomia savânica (campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto*) (Coutinho, 1978 e 2006).

A fisionomia savânica propriamente dita ocupa 67% da área de Cerrado e os cerradões perfazem 10%. Este amplo domínio justificaria considerar o Cerrado como um bioma de savana. Porém, do ponto de vista fitofisionômico pode-se dizer que o Cerrado não é um bioma único, mas um complexo de biomas, formado por um mosaico de comunidades pertencentes a um gradiente de formações ecologicamente relacionadas (Coutinho, 2006).

O Cerrado ocupa a porção central do Brasil, e apresenta em partes dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo, Tocantins, além do Distrito Federal (Figura 1) (IBGE, 2004; Klink e Machado, 2005; Sano *et al.*, 2008).

Segundo Sano *et al.* (2008) quase 40% da área total do cerrado está ocupada com usos da terra diferentes do domínio Cerrado. As duas classes mais representativas de diferente uso da terra são pastagens e culturas agrícolas, ocupando cerca de 26% e 10,5% deste bioma respectivamente, com distribuição espacial bastante heterogênea.

No estado de São Paulo no período entre 1962 e 1992 a redução das áreas de cerrado foi de 82%, devido principalmente a substituição por cana-de-açúcar, pastagens, culturas temporárias e citricultura (Kronka, 1998). Os remanescentes de cerrado no estado de São Paulo ocorrem na forma de inúmeros fragmentos dispersos (menores que 100 ha.) dos quais 5% estão localizados no interior de Unidades de Conservação (São Paulo, 1994). Dados mais recentes indicam que os

estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul foram os que apresentaram os menores índices de cobertura vegetal natural, correspondendo a 15, 32 e 32% respectivamente (Sano *et al.*, 2008).

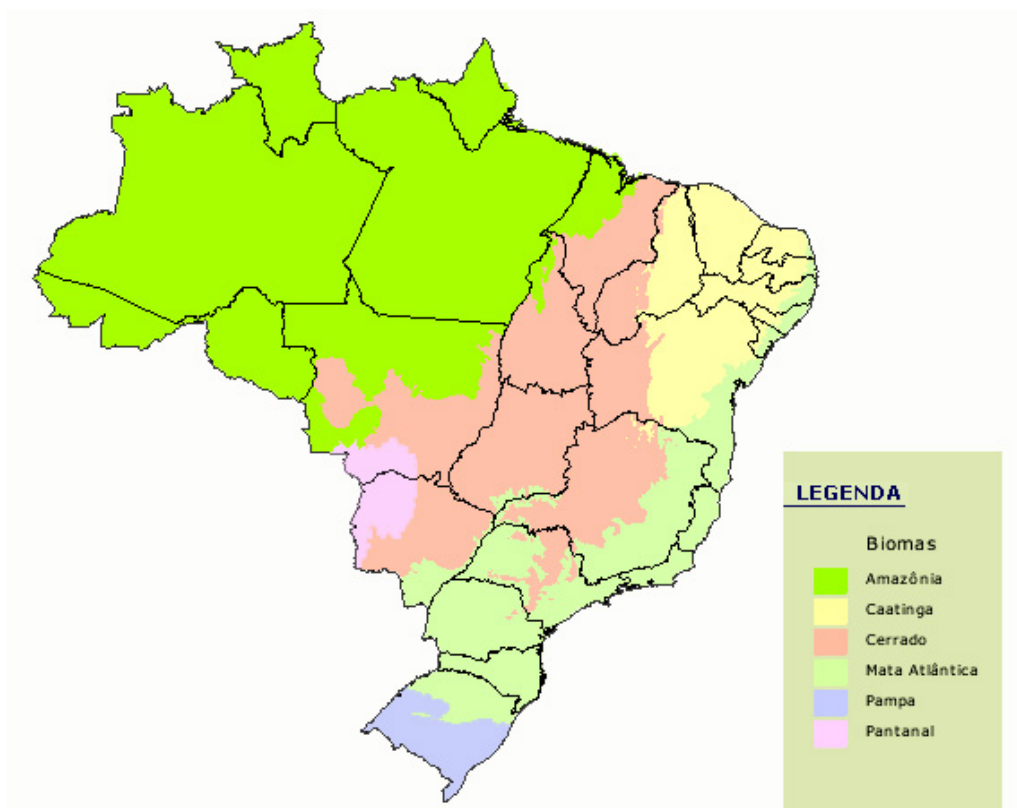


Figura 1 – Distribuição espacial dos Biomas do Brasil (escala 1:5.000.000, IBGE, 2004).

Segundo Klink e Machado (2005) as transformações ocorridas no Cerrado também trouxeram grandes danos ambientais com degradação dos ecossistemas, fragmentação de habitat, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, alteração nos regimes de queimada, desequilíbrio no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais.

Diante da rápida redução das áreas de cerrado é de grande importância o estudo referente à diversidade de espécies neste bioma, incluindo programas de reflorestamento e replantio de espécies nativas. Assim, informações sobre interações ecológicas nestas áreas são essenciais e, entre elas estão incluídas a competição e alelopatia entre espécies.

A alelopatia pode ser definida como qualquer processo envolvendo substâncias (aleloquímicos) produzidas por plantas, que uma vez liberados no

ambiente, influencia o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas nas proximidades, seja de forma positiva ou negativa (Mallik, 2005).

O primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de outras plantas vizinhas foi descrito por Theophrastus (300 A.C.) um discípulo de Aristóteles, que propôs que a leguminosa *Cicer arietinum* exauria o solo (Rice, 1984). Em 1832, o botânico De Candolle sugeriu que o cansaço da terra na agricultura era decorrente de exudados liberados pelas plantas da própria cultura (Rice, 1984). Em 1937, o pesquisador alemão Hans Molisch estudou o efeito do etileno no crescimento das plantas e criou a palavra “alelopatia”, proveniente da união de duas palavras gregas “allelon” (“mútuo”) e “pathos” (“prejuízo”). Apesar do significado etimológico da palavra alelopatia, Molisch define que o termo engloba tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais entre uma planta e outra (Einhellig, 1995).

Rice (1974) na primeira edição de seu livro, “Allelopathy”, limita o termo alelopatia como sendo apenas uma interação prejudicial. Putnan e Duke (1978) consideram que o termo alelopatia talvez seja tecnicamente errôneo, uma vez que significaria somente 'prejuízo mútuo'. No entanto, Rice (1984) na segunda edição de seu livro com o mesmo título, revisou seu conceito e abrangeu a definição original do termo, o qual inclui também o efeito benéfico.

Em 1969 Muller criou o termo interferência – englobando coletivamente todas as interações que se desencadeiam entre os indivíduos de uma comunidade, reunindo os termos de alelopatia e competição (Einhellig, 1995). Por se tratar de um termo muito amplo, Szczepanski (1977) o dividiu em três tipos distintos: alelospolia – ou competição, onde organismos provocam a retirada ou redução de fatores do ambiente, como água, luz, nutriente; alelomediação – ou interferência indireta, onde as alterações são causadas no ambiente por organismos, com reflexos nos seres vizinhos, como a escolha alimentar seletiva de um herbívoro; e alelopatia – interferência causada por substâncias produzidas por certos indivíduos e que no ambiente afetam outros indivíduos da comunidade (Pires e Oliveira, 2001).

O termo aleloquímico (“allelochemicals”) foi cunhado como sendo agentes químicos de importância essencial para a adaptação de espécies e organização das comunidades (Wittaker e Feeny, 1971). O termo aleloquímica (“allelochemicals”) é foi utilizado para descrever todas as interações bioquímicas entre organismos tanto inter quanto intra-especificamente (Chou, 1999).

Putnan e Duke (1978) introduziram ao conceito de alelopatia, os termos de 'planta doadora', como aquela que libera substâncias e interfere na germinação e/ou crescimento de outra planta, que seria a 'planta receptora'.

Recentemente, Miller (1996) classificou o efeito alelopático em dois tipos: autotoxicidade, que ocorre quando plantas de uma espécie liberam compostos químicos que interferem na germinação e/ou crescimento de plantas da mesma espécie; e heterotoxicidade, quando uma planta produz substâncias que são tóxicas para germinação e/ou crescimento de plantas de outras espécies. O processo de autotoxicidade vem sendo observado tanto em ambientes naturais como em ecossistemas manipulados, causando inúmeras implicações, tanto ecológicas quanto econômicas, como declínio de produções agrícolas e problemas na regeneração de algumas áreas naturais.

Segundo Singh *et al.* (1999) as espécies que possuem o mecanismo de autotoxicidade podem regular suas populações no espaço e no tempo, evitando competição intra-específica, favorecendo sua própria perpetuação e tendo uma melhor distribuição geográfica. No entanto, não há evidência que estas espécies sejam favorecidas pela seleção natural. Várias espécies de coníferas são exemplos de espécies que possuem o mecanismo de autotoxicidade. Para Seigler (1996) o processo de autotoxicidade tem a função positiva de manter espaçamento entre indivíduos para prevenir o desenvolvimento de predadores, de bactérias ou fungos patogênicos, assim como promover a polinização cruzada entre indivíduos.

Em uma comunidade natural, diversos mecanismos ecológicos acontecem concomitantemente e devido à complexidade que envolve estes mecanismos torna-se difícil distingui-los. Este fato não é diferente quanto aos processos de alelopatia e competição, tanto que alguns autores preferem defini-los conjuntamente através do termo "interferência". No entanto, é importante distinguir os processos de alelopatia e de competição, que são considerados mecanismos opostos, uma vez que a competição acontece pela retirada ou redução de fatores (como água, luz, nutrientes) e a alelopatia acontece pela introdução ou liberação de elementos no ambiente.

Além da atividade proveniente de compostos simplesmente liberados pelas plantas, os quais não sofrem qualquer transformação, sempre há a possibilidade de microrganismos modificarem compostos não tóxicos para tóxicos, como no caso da 'amedalina' em resíduos de pêssego. Além disso, é possível que microrganismos

sintetizem inibidores, como na produção da substância 'patulina' pelo microrganismo *Penicillium urticae* que cresce em resíduo de palha de trigo (*Triticum aestivum*). Essas mudanças podem acrescentar uma nova forma de atuação dos aleloquímicos de uma planta (Rice, 1984).

A ação de vários aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, por este motivo torna-se difícil sintetizar o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996). No entanto, alguns autores (Rice, 1984; Einhelling, 1986; Inderjit e Dakshini, 1995; Chou, 1999; Reigosa *et al.*, 1999) listaram inúmeros mecanismos de ação dos aleloquímicos que afetam vários processos fisiológicos das plantas, como por exemplo, os processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura dos estômatos, nível de fitormônio, disponibilidade de mineral, e ainda, a divisão e alongamento celular, estrutura e a permeabilidade de membranas e paredes das células.

A maioria dos trabalhos relata que os compostos alelopáticos agem como inibidores da germinação e do crescimento (Juan Jiménez-Osornio *et al.*, 1996; Viles e Reese, 1996; Rawat *et al.*, 1998; Vacarini *et al.*, 1999). Porém, alguns trabalhos demonstraram que estes compostos podem atuar como promotores de crescimento (Yamada *et al.*, 1995 e Yokotani-Tomita *et al.*, 1998). Aparentemente, a maior parte, se não todos os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, são estimulantes em menores concentrações (Rice, 1984).

A produção de aleloquímicos pelas plantas pode ser regulada por fatores como a temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de água, nutrientes, textura do solo e microrganismos (Chou, 1986), além da radiação ultravioleta, doenças e ataque de insetos (Einhelling, 1996 e 2004).

Einhelling (1996) enfatiza que condições ambientais (ou seja, estresse) modificam a taxa de produção dos aleloquímicos, e podem aumentar a concentração destes compostos, e assim proporcionar uma maior inibição nas plantas receptoras, o que se caracteriza por um importante mecanismo de defesa das plantas. Rice (1984) observou que dias longos aumentam a concentração de ácidos fenólicos e terpenos em muitas espécies de plantas. Observou também que a deficiência de diversos minerais (boro, cálcio, magnésio, fósforo, nitrogênio ou enxofre) causou um aumento da concentração de ácido clorogênico e escopoletina em muitas plantas.

Hall *et al.* (1982) observaram que *Helianthus annuus* produziu maior quantidade de ácido clorogênico quando em condições de baixa disponibilidade nutricional. Kong *et al.* (2002) também verificaram que o efeito alelopático de *Ageratum conyzoides* sobre várias outras espécies foi aumentado quando estas foram colocadas em condições de estresse de nutrientes e competição.

Segundo Chou (1986 e 1999) a alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico que influencia a dominância e sucessão de plantas, formação de comunidades, vegetação clímax e manejo. Esta interação alelopática, responsável pelo estabelecimento e sobrevivência de certas espécies no meio ambiente, é feita através de um mecanismo de defesa e ataque das plantas, que vem sendo adquirido ao longo de um processo de evolução (Nishimura e Mizutani, 1995). Seigler (1996) sugere que o processo de coevolução possa ter relação com os compostos metabólicos pela habilidade de algumas plantas conseguirem se desintoxicar ou metabolizá-los.

Segundo Durigan e Almeida (1993) a influência na composição específica e quantitativa das comunidades florísticas, tanto no espaço quanto no tempo, acontece pela existência de uma enorme variedade de aleloquímicos que podem favorecer ou prejudicar certas espécies. A sucessão pode ser afetada pela alelopatia, permitindo a permanência de espécies pioneiras graças à liberação de aleloquímicos (Reigosa *et al.*, 1999).

Na agricultura, há anos se conhece o problema do “cansaço da terra” e a ele era inferido apenas a infertilidade da mesma ou a competição entre espécies. Recentemente, estudos comprovam que a esse problema está associado muitas vezes o processo alelopático. Os estudos vêm se intensificando na agricultura, com relação à alelopatia e principalmente, com a atividade alelopática das ervas daninhas (Young e Bartholomew, 1981; Almeida *et al.*, 2000; Souza Filho *et al.*, 2003, 2005) das culturas ou espécies sobre as ervas daninhas (Rodrigues *et al.*, 1992; Souza Filho *et al.*, 1997; Almeida e Rodrigues, 2001), alelopatia entre culturas ou estudos direcionados para as produções agrícolas. (Almeida, 1991; Santos *et al.*, 2001 e 2002; Souza e Furtado, 2002; Tokura e Nobrega, 2006).

Além disso, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais através da alelopatia com o manejo de ervas daninhas, através da rotação de culturas, sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, adubação verde, além de sistemas agroecológicos (Baruah *et al.*, 1994;

Weston, 1996; Chou *et al.*, 1998; Rodrigues e Rodrigues, 1999; Wu *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002; Kato-Noguchi, 2003).

Rizvi *et al.* (1999) enfatiza a importância de sistemas agroflorestais (uso de associações de espécies arbóreas com a agricultura) para o uso sustentável da terra e o aumento da produtividade agrícola. Nestas associações, o conhecimento das potencialidades alelopáticas é de essencial importância para o sucesso dos sistemas agroflorestais. O mesmo autor lista aproximadamente 80 espécies consideradas agroflorestais (AF) com potencialidades alelopáticas, espécies com potencial contra patógenos de culturas e insetos, além de aleloquímicos já isolados que combatem espécies de ervas daninhas.

Harborne (1997) sugere que os metabólitos secundários têm função defensiva, ajudando o crescimento da planta que os produz e ainda, que estes compostos, possuem função ecológica de defender a planta contra herbívoros. Segundo o mesmo autor os metabólitos secundários atuam também como atrativos para polinizadores, ferormônio, além da ação alelopática (Harborne, 1991).

Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caule, e sementes (Putnan e Tang, 1986). Para Friedman (1995) todos os órgãos da planta têm potencial para armazenar aleloquímicos, mas a quantidade e o caminho pelos quais são emitidos diferem de espécie para espécie.

Rice (1984) propôs um agrupamento dos compostos químicos que possuem atividade alelopáticas em 14 categorias, de acordo com suas próprias vias de síntese. Estes compostos incluem as principais classes de quinonas, fenóis, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos, esteróides, alcalóides, entre outras. Taiz e Zeiger (2004) didaticamente classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

Os terpenos constituem o maior grupo de produtos secundários. Todos os terpenos derivam da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano. Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes, no mínimo. Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA são ligadas, e a partir de uma série de etapas desta rota formam o ácido mevalônico, este então, sofre transformações produzindo o isopentenil difosfato (IPP2) (unidade básica ativa na formação dos

terpenos). Os elementos estruturais básicos dos terpenos são chamados de unidades isoprênicas, assim, todos os terpenos são, ocasionalmente referidos como isoprenóides (Harborne, 1991; Santos, 2003; Taiz e Zeiger, 2004).

Os terpenos são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem: os terpenos de 10 carbonos que tem duas unidades de C_5 são chamados de monoterpenos; os de 15 carbonos (3 unidades C_5) são chamados de sesquiterpenos e os terpenos de 20 carbonos (4 unidades C_5) são os diterpenos. Muitos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos possuem atividade alelopática, inibindo as fases da mitose celular e atuando também na integridade das membranas celulares de outras plantas (Duke e Oliva, 2004).

Dentre os triterpenos e esteróides de origem vegetal de importância estão as saponinas. As saponinas possuem uma parte com características lipofílica (triterpeno ou esteróide, chamada de aglicona) e outra parte hidrofílica (açúcares) que determinam uma propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante (Oleszek, *et al.*, 1999; 2003).

As saponinas se classificam de acordo com o núcleo fundamental aglicona (por exemplo, saponinas triterpênicas), ou ainda pelo seu caráter ácido, básico (saponinas esteroidais básicas) ou neutro (saponinas esteroidais neutras, decorrente da presença de nitrogênio também) As saponinas esteroidais básicas são encontradas principalmente no gênero *Solanum*, pertencente à família Solanaceae. Enquanto que as saponinas triterpênicas encontram-se predominantemente em famílias como Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae, Primulaceae e Araliaceae (Schenkel, *et al.*, 2003).

Além das classes de substâncias citadas anteriormente classificadas como terpeno, muitos vegetais possuem misturas de monoterpenos (cerca de 90%) e sesquiterpenos voláteis, chamados óleos voláteis, os quais conferem aroma característico às suas folhas, estes compostos possuem função importante nas interações planta-animal, planta-microrganismos e planta-planta (Vodou, 2007).

Quimicamente a grande maioria dos óleos voláteis é derivada de terpenóides, ou também de fenilpraponóides (unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos). Sendo assim, os óleos voláteis podem variar desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, cetonas, a fenóis, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, éteres, ésteres, entre outros. Dependendo das famílias, os óleos voláteis, podem ocorrer em estruturas especializadas, tais como

Lamiaceae (pêlos glandulares), Lauraceae, Piperaceae, Poaceae (células parenquimáticas diferenciadas), Apiaceae (canais oleíferos) e em Pinaceae e Rutaceae (bolsas lisígenas) (Simões e Spitzer, 2003).

Compostos fenólicos - As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários classificados como compostos fenólicos que contem em sua estrutura um grupo fenol - um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, sendo que muitas destas substâncias são importante defesa para as plantas (Yao *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos são sintetizados por meio de duas rotas básicas (a rota do ácido chiquímico - a partir do ácido cinâmico, e a rota do ácido malônico) razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico, com aproximadamente 10.000 compostos (Taiz e Zeiger, 2004).

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, que por meio da eliminação de uma molécula de amônia forma o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela fenilalanina amônia-liase (PAL), talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário (Raes *et al.*, 2003).

A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primários e secundários, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, hormônios, luz, infecção por fungos e lesões (Taiz e Zeiger, 2004). As reações subseqüentes àquelas catalisadas pela PAL levam à adição de mais grupos hidroxilas e outros constituintes. Os ácidos *trans*cinâmico e *p*-cumárico e seus derivados são compostos fenólicos simples chamados de fenilpropanóides (por conter um anel benzênico e uma cadeia lateral de três carbonos) (Blount, *et al.*, 2000; Taiz e Zeiger, 2004).

Os fenilpropanóides são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos. Entre as compostos de cadeia simples estão as lactonas chamadas de cumarinas e os fenilpropanóides simples (como *trans*cinâmico e *p*-cumárico, ácido caféico, etc). Cerca de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais e entre elas, alguns isômeros podem ser citados: cromonas, furanocromonas, xantonas, furanocumarinas, etc. (Carvalho, *et al.*, 2003; Kuster e Rocha, 2003).

As furanocumarinas que apresentam um anel furano, são compostos atóxicos até que a luz UV os ative. A luz solar, na faixa do ultravioleta (300-400 nm) eleva algumas furanocumarinas a um estado eletrônico de alta energia, estas então ativadas, podem se inserir na dupla hélice do DNA e ligar-se às bases pirimídicas, citosina e timina, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA, podendo provocar até a morte celular (Zobel, 1999; Abenavoli *et al.*, 2004; Hoagland e Willians, 2004; Taiz e Zeiger, 2004). Segundo Diawara e Trumble (1997) isso constitui a base para a compreensão da toxicidade das furanocumarinas para mamíferos, insetos, vírus, bactérias, fungos e até mesmo para outras plantas.

A biogênese das cumarinas pode ser induzida em resposta a estresse biótico e abiótico, por uma deficiência nutricional, por mensageiros químicos, como hormônios vegetais e por outros metabólitos externos (Cabello-Hurtado *et al.*, 1998).

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. O esqueleto de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de 3 carbonos. Essa estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e do ácido malônico (Lima, 2004). Os flavonóides são amplamente encontrados no reino vegetal, e aqueles encontrados nas folhas de uma planta podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode ocorrer em diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (Zuanazzi e Montanha, 2003).

Depois da celulose, uma das substâncias estruturais orgânica mais abundante dentre as plantas é a lignina, que é um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificado e de fórmula complexa e ainda desconhecida parcialmente. Além de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções importantes nos vegetais, como resistência física (dificulta seu consumo pelos herbívoros) e estabilidade química (indigerível pelos animais) (Barbosa Filho, 2003).

Além das ligninas, um segundo grupo de polímeros fenólicos com propriedades de defesa para os vegetais, são os taninos. Estes compostos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. Há duas categorias de taninos: taninos condensados formados pela polimerização de unidades de flavonóides, e os

taninos hidrolisáveis que são polímeros heterogêneos que contêm ácidos fenólicos, em especial o ácido gálico e açúcares simples (Scalbert, 1991; Kraus *et al.*, 2003).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Os taninos condensados ocorrem amplamente em Gymnospermae e Angiospermae, e normalmente são constituintes de plantas lenhosas. Porém, os taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos, inclusive os elagitaninos (um tanino hidrolisável) têm sido utilizado como marcador taxonômico devido a sua distribuição no complexo HDL (Hamamelidae, Dileniidae e Rosidae) (Okuda, 1993).

Assim como as ligninas, os lignóides são derivados da biossíntese que envolve metabólitos primários finais da via metabólica do chiquimato: ácido cinâmico → álcoois cinâmicos → propenilfenóis + alifenois (Gottlieb e Yoshida, 1984). Lignóides é uma designação genérica que caracteriza micromoléculas, cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico. Os lignóides se subdividem em grupos como as lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides dependendo da sua biogênese (Barbosa Filho, 2003).

Mais de 550 lignóides estão relacionados na literatura, sendo que 90% pertencem ao grupo das lignanas e neolignanas. O elevado número de lignanas e neolignanas distribuídas no reino vegetal leva a suposição de que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam essenciais ao desenvolvimento do vegetal e ao controle deste sobre a vida circunjacente (Ward, 1993; 1995), e desempenham um papel importante na adaptação ecológica das plantas terrestres (Gottlieb e Yoshida, 1984).

As lignanas já foram identificadas também com atividades antitumor, antimetabólica, antiviral, inibidora de enzimas, fungicidas, etc (MacRae, 1984), no entanto, poucos trabalhos identificaram a ação alelopática de lignanas e neolignanas (Cuttillo *et al.*, 2003; Macías *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2007).

Compostos nitrogenados - uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui nitrogênio na sua estrutura. Incluindo-se nessa categoria alguns compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra herbivoria, como alcalóides e os glicosídeos cianogênicos.

Os alcalóides representam uma classe de compostos com grande variedade, cuja similaridade é a presença do nitrogênio em sua estrutura (Lima, 2004). Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, e são sintetizados a partir de um ou poucos aminoácido comuns, sobretudo lisina, tirosina, e triptofano. Os alcalóides são encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros da plantas, com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares (Henriques *et al.*, 2003; Taiz e Zeiger, 2004).

Diante da enorme diversidade de compostos, a evolução natural dessas substâncias deve ter selecionado rotas ou substâncias do metabolismo secundário que ofereceram vantagens evolutivas ou adaptativas de algumas espécies no convívio com outras plantas (Macías *et al.*, 2007). Sendo assim, diante da enorme diversidade de compostos químicos produzidos pelas plantas, os estudos em alelopatia podem contribuir para compreender o processo pelo qual é desencadeada a produção destes compostos nas plantas e como elas respondem a estes compostos no meio ambiente.

O presente estudo foi dividido em três capítulos. O primeiro descreve os resultados da atividade alelopática de onze espécies de cerrado, com suas folhas coletadas em épocas distintas (capítulo I). E os dois últimos capítulos abordam os estudos alelopáticos da espécie de cerrado *Aristolochia esperanzae*, onde os objetivos principais foram entender como a atividade alelopática desta espécie influencia o crescimento da espécie-alvo estudada (capítulo II) e quais as substâncias responsáveis pela atividade alelopática presente nas raízes da espécie doadora (capítulo III).

Referências bibliográficas

- ABENAVOLI, M.R.; SORGONÀ, A.; ALBANO, S.; GIOVANNI, C. (2004). Coumarin differentially affects the morphology of different root types of maize seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 30(9): 1871-1883.
- ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D. (2001). Allelopathy of *Panicum maximum* Jacq. Cultivars on tree and shrub forage legumes: Greenhouse Estimate. *Proceeding of the XIX International Grassland Congress – São Pedro*. GOMIDE, J. A. (Ed); MATTOS, S.W.R. (Ed); SILVA, S.C. (Ed.). Piracicaba, FEALQ, 1097p.
- ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D.; SANTOS, J.M. (2000). Alelopatia de cultivares de *Panicum maximum* Jacq., sobre leguminosas forrageiras arbustivas e arbóreas. I Avaliações em laboratório. *Boletim de Indústria Animal*. N. Odessa, 57(2): 113-127.
- ALMEIDA, F.S. (1991). Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26(2): 221-236.
- BARBOSA FILHO, J.M. (2003). Lignan, neolignan e seus análogos. p. 557-575. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- BARUAH, N.C.; SARMA, J.C.; SARMA, S.; SHARMA, R.P. (1994). Seed germination and growth inhibitory cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. *Journal of Chemical Ecology*, 20(8): 1885-1892.
- BLOUNT, J. W.; KORTH, K.L.; MASOUD, S.A.; RASMUSSEN, S.; LAMB, C.; DIXON, R. A. (2000). Altering Expression of Cinnamic Acid 4-Hydroxylase in Transgenic Plants Provides Evidence for a Feedback Loop at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 122: 107-116.
- BORGES, F.C.; SANTOS, L.S.; CORRÊA, M.J.C.; OLIVEIRA, M.N. SOUZA-FILHO, A.P.S. (2007). Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). *Planta Daninha*, 25(1): 55-59.
- CABELLO-HURTADO, F. DURST, F. JORRÍN, V.J.; WERCK-REICHHART, D.W. (1998). Coumarins in *Helianthus tuberosus* characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49 (4): 1029-1036.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. (2003). Compostos fenólicos simples e heterosídicos. p. 519-556. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- CHOU, C.H. (1986). The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. p. 57-73. In: PUTNAM, A.R. e TANG, C.S. *The science of allelopathy*. New York: John Wiley e Sons, 317p.

- CHOU, C.H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science* 18(5): 609-636.
- CHOU, C.H.; FU, C.Y.; LI, S.Y.; WANG, Y.F. (1998). Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. *Journal of Chemical Ecology*, 24(12): 2131-2150.
- COUTINHO, L. M. (2006). O conceito de Bioma. *Acta Botanica Brasilica*, 20:(1),13-23.
- COUTINHO, L.M. (1978). O conceito do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 1:17-23.
- CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; DELLACRECA, M.; FIORENTINO, A.; ZARRELLI, A. (2003). Lignans and neolignans from *Brassica fruticulosa*: effects on seed germination and plant growth. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51(21): 6165-6172.
- DIAWARA, M.M.; TRUMBLE, J.T. (1997). In: MELLO, F.D. *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, New York: CRC Press, 368p.
- DUKE, S.O.; OLIVA, A. (2004). Mode of action of phytotoxic terpenoids. p. 201-216. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. *Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals*. Washington: CRC Press, 372p.
- DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. (1993). *Noções sobre a alelopatia*, Jaboticabal: FUNEP, 28p.
- EINHELLIG, F.A. (1986). Mechanisms and modes of action of allelochemicals. p. 171-188. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. *The science of allelopathy*. New York: John Wiley & Sons, 317p.
- EINHELLIG, F.A. (1995). Allelopathy: Current status and future goals. p. 1-25. In: INDEJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Ed). *Allelopathy: organisms, processes and applications*. Washington: American Chemical Society. 551p.
- EINHELLIG, F.A. (1996). Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal*, 88: 886-893.
- EINHELLIG, F.A. (2004). Mode of allelochemical action of phenolic compounds. p. 217-238. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. *Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals*, Washington: CRC Press, 372p.
- FRIEDMAN, J. (1995). Allelopathy, autotoxicity, and germination. p. 629-644. In: KIGEL, J; GALILI, G. (Ed.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 853p.
- GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M. (1984). Lignóides, com atenção especial à química das neolignanas. *Química Nova*, 250-273.
- HALL, A.B.; BLUM, U.; FITES, R.C. (1982). Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. DEBRIS on seed germination. *American Journal of Botany*, 69(5): 776-783.

- HARBORNE, J.B. (1991). Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. p. 399-426. *In: HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A. (Ed.). Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids.* New York: Oxford Science Publications. 378p.
- HARBORNE, J.B. (1997). Plant secondary metabolism. p. 132-155. *In: CRAWLEY, M.J. (Ed.). Plant Ecology.* Blackwell Science. 717p.
- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. (2003). Alcalóides: generalidades e aspectos básicos p.765-791. *In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia - da planta ao medicamento.* 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. (2004). Bioassays - Useful tools for the study of allelopathy. p. 315-351. *In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals,* Washington: CRC Press, 372p.
- IBGE.- O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2004). Mapa de biomas do Brasil. - Primeira Aproximação: escala 1:5.000.000 - Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>. Acesso em 19 jul. 2008.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. (1995). On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*, 61(1): 28-44.
- JUAN JIMÉNEZ-OSORNIO, F.M.V.Z.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. (1996). Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides*. L. *Biochemical Systematic and Ecology*, 24(3): 195-205.
- KATO-NOGUCHI, H. (2003). Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm. *Scientia Horticulturae*, 97: 419-423.
- KHAN, Z.R.; HASSANALI, A.; OVERHOLT, W.; KHAMIS, T.; HOOPER, A.M.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. (2002). Control of witchweed *Striga hermonthica* by intercropping with *Desmodium* spp., and the mechanism defined as allelopathic. *Journal of Chemical Ecology*, 28(9): 1871-1885.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1:147-155.
- KONG, C; HU, F.; XU, X. (2002). Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Ageratum conyzoides* under stress. *Journal of Chemical Ecology*, 28(6): 1173-1182,
- KRAUS, T.E.C.; DAHLGREN, R.A.; ZASOSKI, R.J. (2003). Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. *Plant and Soil*, 256: 41-66.
- KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; PAVÃO, M. (1998). *Áreas de domínio do cerrado no estado de São Paulo.* São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 84 p.
- KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. (2003). Cumarinas, cromonas e xantonas. p. 538-556. *In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.;*

- MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- LIMA, M.I.S. (2004). Substâncias do metabolismo secundário de algumas espécies nativas e introduzidas no Brasil. p. 33-40. *In: LARCHER, W. Ecofisiologia Vegetal*. PRADO, C.H.B.A.; FRANCO, A.C. (trads). São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.; GALINDO, C.G. (2007). Evaluation and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, 68: 2917-2936.
- MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. (2004). Bioactive lignans from a cultivar of *Helianthus annuus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6443-6447.
- MACRAE, W.D.; TOWERS. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23(6): 1207-1220.
- MALLIK, A. (2005). *Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities International Allelopathy Society*. The Fourth World Congress on Allelopathy was held at Charles Sturt University in Wagga Wagga, NSW, Australia in August 2005. <http://www.regional.org.au/au/allelopathy/>
- MILLER, D.A. (1996). Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal*, 88: 854-859.
- NISHIMURA, H.; MIZUTANI, J. (1995). Identification of allelochemicals in *Eucalyptus citriodora* and *Polygonum sachalinense*. p. 74-85 *In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Ed.) Allelopathy - organisms, processes and applications*. Washington: American Chemical Society, 388p.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. (1993). Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, 32 (3): 507-521.
- OLESZEK, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. (2003). Saponinas. p. 711-740. *In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- OLESZEK, W.A.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R.M. (1999). Ecological significance of plant saponins. p. 451-465. *In: INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., FOY, C.L. (eds). Principles and Practices in Plant Ecology – Allelochemical Interactions*. CRC Press, 551p.
- PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. (2001). Alelopatia. p. 145-185. *In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Coord.). Plantas daninhas e seu manejo*. Guaíba: Agropecuária. 362p.
- PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. (1978). Allelopathy in agroecosystems. *Annual Review Phytopathol*, 16: 431-451,
- PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. (1986). Allelopathy: state of the science. p. 1-19. *In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. The science of allelopathy*. New York: John Wiley & Sons, 317p.

- RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; PEER, Y.V.; BOERJAN, W. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133: 1051-1071.
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. (1998). Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 26: 13-23.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(5): 577-608.
- RICE, E. L. (1974). *Allelopathy*. New York: Academic Press, 353 p.
- RICE, E. L. (1984). *Allelopathy*. New York: Academic Press, 423 p.
- RIZVI, S.J.H.; TAHIR, M.; RIZVI, V.; KOHLI, R.K.; ANSARI, A. (1999). Allelopathic interactions in agroforestry systems. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(6): 773-796.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. (1999). Alelopatia e adubação verde. p. 93-107. In: AMBROSANO, E. (coord.). Agricultura Ecológica. Ed. Livraria e Editora Agropecuária. 398p.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. (1992). *Alelopatia em plantas forrageiras*. Jaboticabal: FCAVJ- UNESP/FUNEP. 18p. (Boletim).
- SANO, E.E.; ROSA, R.R.; BRITO, J.L.S.; FERREIRA, L.G. (2008). Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(1): 153-156. Nota Científica.
- SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F.; MENDES, A.N.G; MORAIS, A.R.; CONCEIÇÃO; H.E.O.; MARINHO, J.T.S. (2002). Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(6): 783-790.
- SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F.; MENDES, A.N.G; MORAIS, A.R.; CONCEIÇÃO; H.E.O.; MARINHO, J.T.S. (2001). Influência alelopática das coberturas mortas de casca de café (*Coffea arabica* L.) e casca de arroz (*Oryza sativa* L.) sobre o controle do caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) em lavoura de café. *Ciência e Agrotecnologia*, 25(5): 1105-1118.
- SANTOS, R.I. (2003). Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. p. 403-434. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- SÃO PAULO, SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE. (1997). *Bases para a conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do Estado de São Paulo*. São Paulo: série Probio/SP.
- SCALBERT, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3881.

- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. (2003). Saponinas. p. 711-740. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- SEIGLER, D. S. (1996). Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. (2003). Óleos voláteis. p. 467-495. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.
- SINGH, H.P.; BATISH, J.K.; PANDHER, J.K.; KOHLI, R.K. (1999). Autotoxicity: concept, organisms, and ecological significance. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(6): 757-772.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C. (2003). Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e da densidade de sementes da planta receptora. *Planta Daninha*, 21(2): 211-218.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. (2005). Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, 23(1): 25-32.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. (1997). Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 32 (2):165-170.
- SOUZA, I.T.; FURTADO, D.A.S. (2002). Caracterização de aleloquímicos do centeio (*Secale cereale*) e seu potencial alelopático sobre plantas de alface (*Lactuca sativa*). *Ciência e Agrotecnologia*, 26(5): 1097-1099.
- SZCZEPANSKI, A. J. (1977). Allelopathy as a means of biological control of water weeds. *Aquatic Botany*, 3: 193-197.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p.
- TOKURA, L.K.; NÓBREGA, L.H.P. (2006). Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. *Acta Scientiarum Agronomy*, 28 (3): 379-384.
- VACCARINI, C.E.; PALACIOS, S.M.; MERAGELMAN, K.M.; SOSA, V.E. (1999). Phyto-growth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. *Phytochemistry*, 50(2): 227-230.
- VILES, R.N.; REESE, R.N. (1996). Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. *Environmental and Experimental Botany*, 36(1): 39-43.
- VODOU, D. (2007). Allelochemicals, allelopathy and essential oils: a field in search of definitions and structure. *Allelopathy Journal*, 19(1): 119-134.
- WARD, R.S. (1993). Lignans, neolignans, and related compounds. *Natural Product Reports*, 10: 183-205.

- WARD, R.S. (1995). Lignans, neolignans, and related compounds. *Natural Product Reports*, 12(83): 43-74.
- WESTON, L.A. (1996). Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, 88: 860-866.
- WITTAKER, R.H.; FEENY, P.P. (1971). Allelochemicals: Chemical interaction between species. *Science*, 171 (3973): 757-770.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. (2000). Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9): 141-2154.
- YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. (1995). Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. *Phytochemistry*, 39(5): 1031-1032.
- YAO, Q.; ZHU, H.H.; ZENG, R.S. (2007). Role of phenolic compounds in plant defence: induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Allelopathy Journal*, 20(1): 1-14.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. (1998). Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, 47(1): 1-2.
- YOUNG, C.C.; BARTHOLOMEW, D.P. (1981). Allelopathy in a grass-legume association: I. Effects of *Hemarthria altissima* (Poir.) and Hubb. Root residues on the growth of *Desmodium intortum* (Mill.) Urb. and *Hemarthria altissima* in a tropical soil. *Crop Science*, 21: 770-774.
- ZOBEL, A.M. (1999). Allelochemical function of coumarins on the plant surface. p.439-449. In: INDERJIT, DAKSHINI, k.M.M., FOY, C.L. *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. Boca Raton: CRC Press. 589p.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. (2003). Flavonóides. p. 577-614. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102 p.

“EFEITO DA SAZONALIDADE NA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE FOLHAS DE ONZE ESPÉCIES COLETADAS EM ÁREA DE CERRADO”

RESUMO – (Efeito da sazonalidade na atividade alelopática de folhas de onze espécies coletadas em área de cerrado). A alelopatia é um fenômeno fortemente associado na interação da planta doadora com o seu ambiente e estudos têm mostrado que intensidade da produção de aleloquímicos é uma resposta a diferentes fatores, principalmente em situações de estresse. O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade alelopática de folhas de onze espécies do cerrado coletadas em períodos seco e chuvoso. Foram realizados experimentos de germinação com os extratos provenientes das onze espécies, onde foram avaliadas a porcentagem de germinação, velocidade de germinação, entropia informacional e a frequência relativa de germinação. Dentre as espécies estudadas pode-se verificar que *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* inibiram mais significativamente a germinação de sementes de alface quando a coleta foi realizada na estação seca. Extratos de cinco espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) atrasaram a germinação das sementes de alface e gergelim quando suas folhas foram coletadas no período de seca. Pode-se concluir que as diferenças obtidas nos testes de alelopatia deste trabalho, podem ser devido às plantas estarem expostas a diferentes tipos de estresse (onde vários fatores podem atuar) e conseqüentemente induzirem a uma maior produção de aleloquímicos na estação seca.

Palavras-chave: cerrado, germinação, velocidade de germinação, estação seca, estação chuvosa.

ABSTRACT: (Seasonality effect in allelopathic activity of eleven species cerrado leaves). Allelopathy is a phenomenon strongly related with the interaction of donor plant to the ambient and the intensity of allelochemistry produced is an output to different factors, mainly in stress condition. The purpose of this work was compare the leaves allelopathic activity of eleven cerrado species collected at dry and rainy season. It was accomplished germination tests with this 11 species extracts, and evaluated the germination percentage, rate, entropy and relative frequency. Among the studied species it was observed that *Davilla elliptica* and *Miconia albicans* inhibited more significantly the lettuce seed germination to leaves collected at dry season. Extracts of five species (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* and *Schefflera vinosa*) delayed the germination of lettuce and sesame seeds when their leaves were collected at dry season. The results gotten on this work appoint that the increase of allelochemistry production could be related to different kinds of stress (where many factors could interact) like the dry season.

Key words: cerrado, germination, germination rate, dry season, rainy season.

Introdução

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia, ocupa uma área de 204,7 milhões de hectares na porção central do Brasil (Klink e Machado, 2005).

O cerrado é considerado como uma savana e, este termo, engloba dois conceitos: um de natureza fitofisionômica e, outro que se refere a um grande ecossistema, com seu tipo particular de vegetação. Do ponto de vista fitofisionômico, porém, pode-se dizer que o Cerrado não é um bioma único, mas um complexo de biomas, formado por um mosaico de comunidades pertencentes a um gradiente de formações ecologicamente relacionadas, que vai de campo limpo a cerradão. (Coutinho, 2006).

Os solos de cerrado se caracterizam por pH ácido, alta saturação de alumínio e baixa disponibilidade de nutrientes, principalmente de P, Ca e Mg (Haridasan, 2001). Além disso, uma outra característica marcante do cerrado é o clima estacional, onde ocorre um período chuvoso, de outubro a março, seguido por um período seco, de abril a setembro (Klink e Machado, 2005). Durante a estação seca no cerrado, o solo está sujeito a um déficit hídrico sazonal nas camadas mais superficiais (Haridasan, 2001), razão pela qual, esta época pode representar um período de estresse para as plantas neste ambiente (Sarmiento, 1996).

A alelopatia é um fenômeno fortemente associado na interação da planta doadora com o seu ambiente (Blanco, 2007) e estudos têm mostrado que intensidade da produção de aleloquímicos é uma resposta a diferentes fatores, sejam eles bióticos ou abióticos (Chaves e Escudero, 1999).

A alelopatia pode ser definida como o efeito prejudicial ou benéfico entre plantas ou microrganismos por meio de substâncias, denominadas de aleloquímicos. A influência na composição específica e quantitativa das comunidades florísticas, tanto no espaço quanto no tempo, acontece pela existência de uma enorme variedade de aleloquímicos que podem favorecer ou prejudicar certas espécies (Durigan e Almeida, 1993).

A alelopatia pode ainda influenciar a dominância e sucessão de plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas, sendo assim reconhecida como importante mecanismo ecológico (Chou, 1999). Esta

influência alelopática pode ser expressa na germinação de sementes e/ou estabelecimento e desenvolvimento de indivíduos vizinhos (Ferreira, 2005).

A produção de aleloquímicos pelas plantas pode ser regulada por fatores como a temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, textura do solo, microrganismos, ataque de insetos e disponibilidade de água e nutrientes (Chou, 1986; Einhellig, 1996). Por exemplo, os teores de óleo volátil de *Lippia alba*, uma espécie do Cerrado, foram superiores na estação seca em relação à estação chuvosa (Santos e Innecco, 2003). Além disso, extratos aquosos de *Mimosa bimucronata* inibiram a germinação de espécies hortícolas e esta inibição foi dependente da época de coleta das folhas da espécie doadora e da espécie alvo (Jacobi e Ferreira, 1991).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de onze espécies do cerrado coletadas em períodos seco e chuvoso.

Material e métodos

Área de estudo

A coleta do material biológico foi realizada na área de reserva de cerrado “*senso stricto*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (Figura 1).

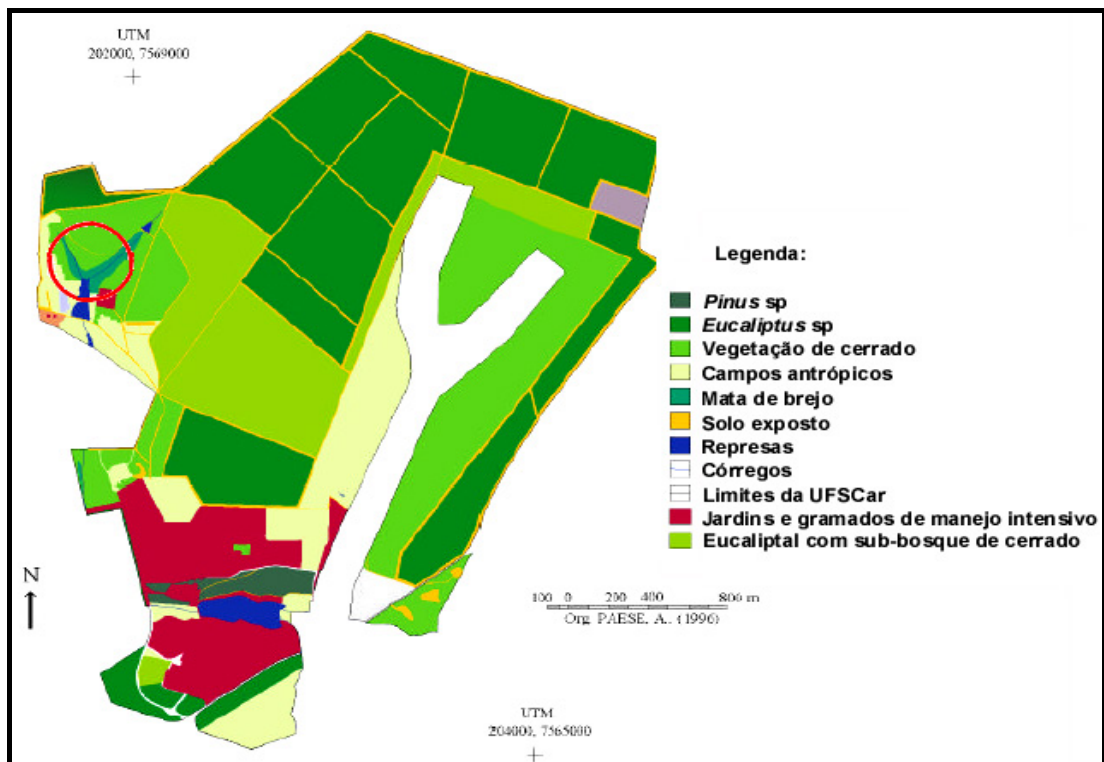
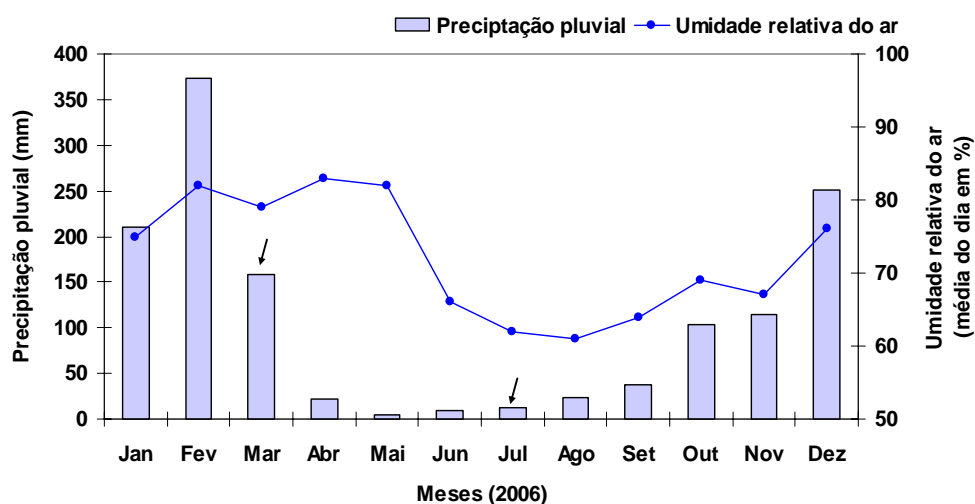


Figura 1 - Diferentes usos do solo no campus da UFSCar. A área assinalada com um círculo vermelho corresponde ao local de coleta das espécies. (Adaptado de Paese, 1997).

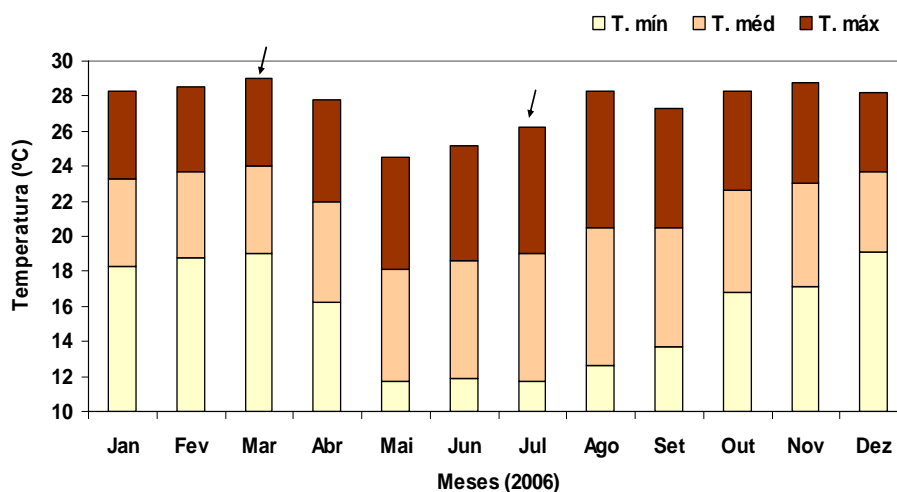
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Germinação de Sementes do Departamento de Botânica e as folhas foram coletadas no mês de março (30/03/2006) e julho (27/07/06).

Como se pode observar os valores de precipitação pluvial no mês de março estiveram em torno de 160 mm, após o mês que teve o maior índice do ano (fevereiro com 375 mm) (Figura 2A). No mês de março a temperatura mínima foi de

19°C e máxima de 29°C. Para o mês de julho o valor de precipitação foi de 13,2 mm, seguido de meses com valores próximos a este, caracterizando a época de baixa precipitação pluvial e umidade relativa do ar, associada a isto a temperatura mínima ficou em torno de 11°C e a máxima 26°C. Obtendo assim para esta região a ocorrência de uma estação quente e chuvosa e outra estação mais fria e seca.



A



B

Figura 2 – Precipitação pluvial e umidade relativa do ar (A) e temperaturas mínima, média e máxima (B) para os meses de 2006. Dados coletados pela Estação Meteorológica da EMBRAPA Sudeste (São Carlos – S.P.) As setas indicam os meses de coleta das onze espécies.

Espécies estudadas

As espécies estudadas, suas famílias e algumas características estão relacionadas abaixo:

***Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg** - Fabaceae
(Mimosoideae)

Esta espécie também é conhecida popularmente por angico-do-cerrado, angico-preto, é uma árvore de grande porte, com casca marrom escura muito espessa e fendilhada, suas folhas são alternadas compostas. Ocorre em fisionomias de cerrado, em cerrado *senso-stricto* e em cerradão (Durigan *et al.*, 2004).



***Davilla elliptica* A.St.-Hil.** - Dilleniaceae

O porte desta espécie é arbustivo ou de trepadeira lenhosa, possui casca esfoliativa avermelhada e suas folhas são alternas simples, ásperas na face superior e coriáceas, ela é conhecida popularmente de cipó-caboclo, cipó-de-homem ou lixeirinha e ocorre em cerrado *senso-stricto* e em cerradão (Silva Jr, 2005).



***Diospyros hispida* A. D** - Ebenaceae

Conhecida como caqui-do-cerrado, esta espécie pode ser encontrada como arbusto ou árvore pequena, tortuosa, com casca irregularmente fendilhada, suas folhas são simples e coriáceas. São encontradas em fisionomias campestres de cerrado, cerrado *senso-stricto* e em cerradões (Durigan *et al.*, 2004).



***Kielmeyera coriacea* (Spreng.) Mart** - Clusiaceae

Também chamada de para-tudo ou pau-santo, é uma espécie de hábito arbustivo-arbórea de tronco tortuoso e casca suberosa espessa, possui folhas simples alternadas e coriáceas, são encontradas em fisionomias campestres de cerrado e em cerrado *senso-stricto* (Durigan *et al.*, 2004).



***Miconia albicans* (Sw.) Triana - Melastomataceae**

Espécie conhecida popularmente por quaresmeira-branca ou folha-branca, possui folhas simples e tem hábito arbustivo ou de arvoreta. Esta espécie é amplamente distribuída nas fisionomias campestres de cerrado, em cerrado *sensu stricto* e cerradão (Durigan *et al.*, 2004)

***Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker - Asteraceae**

Espécie conhecida também por candeia ou paratudo, possui hábito arbustivo ou é encontrada também como arvoreta. Possui casca espessa e fendilhada, folhas simples, alternadas e coriáceas. Ocorrem em fisionomias campestres de cerrado, em cerrado *sensu-stricto* e em cerradão (Durigan *et al.*, 2004).

***Schefflera vinosa* (Cham. & Schtdl.) Frodin - Araliaceae**

Esta é uma espécie de hábito arbustivo ou árvore de pequeno porte, possui caule todo recoberto e suas folhas são alternadas e coriáceas (Ferri, 1969).

***Senna rugosa* (G. Don) Irwin & Barneby - Fabaceae
(Caesalpinioideae)**

Conhecida popularmente como boi-gordo, é uma espécie que possui folhas alternas, compostas e coriáceas. Ocorre em fisionomias campestres de cerrado, em cerrado *sensu stricto*, cerradão e em áreas perturbadas. (Durigan *et al.*, 2004).

***Siparuna guianensis* (Aubl.) - Monimiaceae**

Esta espécie é conhecida popularmente por limão-bravo ou limãozinho, é encontrada como arbusto ou árvore pequena, toda a planta desprende odor desagradável quando cortadas. Possui folhas simples, opostas e ocorre no subosque do cerradão (Durigan *et al.*, 2004). Neste caso foi coletada em cerrado *sensu-stricto*.



***Stryphnodendron polyphyllum* Mart** - Fabaceae (Mimosoideae)

Conhecida como barbatimão, é uma árvore de grande porte (com 4 a 6 metros de altura) possui tronco tortuoso de casca rugosa e suas folhas são compostas bipinadas. Esta espécie ocorre nas diversas fisionomias do cerrado (Lorenzi, 2002).



***Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.** - Annonaceae

Esta espécie é conhecida por pimenta-de-macaco ou pindaíba-do-campo, e tem hábito de árvore pequena com tronco ereto e casca marrom-escuro possui folhas simples, alternadas dísticas e lanceoladas. Ocorre em fisionomias campestres de cerrado, cerrado *sensu-stricto* e cerradão (Silva Jr, 2005).



Preparo dos extratos aquosos

Para obtenção dos extratos foram utilizadas folhas maduras, secas em estufa à 55°C durante 72 horas. Depois de secas, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos mantidos em temperatura de ambiente de laboratório até a realização dos experimentos.

As folhas foram pesadas e trituradas em água destilada com liquidificador durante aproximadamente 1 minuto. Todos os extratos foram feitos obedecendo à concentração de 10% peso/volume (p/v - g/mL). Em seguida, os mesmos foram deixados decantar durante 3 horas. Decorrido este período, os extratos foram filtrados em papel de filtro com auxílio de uma bomba a vácuo e imediatamente utilizado.

Bioensaio de germinação

No bioensaio de germinação foram utilizadas sementes de alface¹ (*Lactuca sativa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.). Para a germinação foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL de extrato (concentração 10% p/v) ou água destilada (controle).

Em seguida, 30 sementes foram distribuídas nas placas, as quais foram mantidas em estufa climatizada (B.O.D.) a 20°C (± 1°C) para as sementes de alface e 28°C (± 2°C) para as de gergelim, com 12 horas de fotoperíodo.

As contagens foram realizadas em intervalo de 12 horas durante os sete primeiros dias, e em intervalo de 24 horas até totalizar dez dias após a semeadura. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular. Os parâmetros analisados foram porcentagem e velocidade de germinação (Labouriau, 1983).

- Porcentagem de germinação

$$G (\%) = (N/A) \times 100$$

onde: G = porcentagem de germinação; N = número de sementes germinadas; A = número total de sementes colocadas para germinar

- Velocidade de germinação

$$V = 1/t$$

onde: V = velocidade média de germinação (dias⁻¹); t = tempo médio de germinação ($t = \sum(n_i \cdot t_i) / \sum n_i$), sendo t_i = tempo de incubação e n_i = número de sementes germinadas no tempo entre dois tempos sucessivos de observações ($t_i - 1$) e (t_i)).

¹ Embora o termo correto seja “cipsela” para os frutos de Asteraceae, neste trabalho será adotado o termo “semente”.

- Frequência relativa

$$f_i = n_i / \Sigma n_i$$

onde: f_i = frequência relativa no tempo; n_i = número de sementes germinadas no tempo (entre dois tempos sucessivos de observações ($t_i - 1$) e (t_i)); Σn_i = número total de sementes germinadas.

- Entropia informacional

Entropia informacional (ou o índice de sincronização de germinação ou incerteza) representa um sinal ambiental (comunicação de energia) entre as sementes e o meio externo, refletindo o nível de organização do processo germinativo (Labouriau e Osborn, 1984). Altos valores de entropia informacional, ou seja, baixos índices de sincronização demonstram uma redução no grau de organização do sistema, levando a uma distribuição mais esparsa no tempo da germinação das sementes (Jeller e Perez, 2001).

$$E = - \Sigma [f_i \cdot \log_2(f_i)]$$

onde: $f_i = n_i / \Sigma n_i$

Característica dos extratos

Foram obtidas as medidas dos potenciais osmóticos dos extratos pela medição da concentração molar em 50 μ L de cada extrato, utilizando um osmômetro (μ Osmotte, modelo 5004 automatic osmometer). As medidas foram obtidas em mOsm/kg e convertidos para pressão osmótica (MPa) através da equação abaixo (Larcher, 2004):

$$\pi = - W \times 0,00832 \times T_{abs}$$

onde: π = Pressão Osmótica em MPa; W = Potencial Osmótico em Osm/kg; T_{abs} - Temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

Posteriormente foi realizado um experimento de germinação com alface e gergelim utilizando-se soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) com potencial osmótico próximo aos encontrados nos extratos, a preparação das soluções de PEG foi realizada seguindo as especificações de Villela *et al.*(1991). Os diásporos de alface e gergelim foram mantidos nas mesmas condições dos bioensaios de germinação, descrito acima.

Tratamento dos dados e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os valores de porcentagem foram transformados em arco seno ($\sqrt{\%}$) (Labouriau, 1983). A comparação das médias foi feita através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do software BioEstat 5.0.

Resultados e Discussão

O potencial osmótico obtido dos extratos de folhas coletadas na estação chuvosa variou de -0,104 a -0,207 MPa, respectivamente para *Diospyros hispida* e *Siparuna guianensis*. Enquanto que para a estação seca os valores variaram de -0,020 a -0,201 respectivamente para as espécies *Piptocarpha rotundifolia* e *Kielmeyera coriacea* (Tabela 1).

Miró *et al.* (1998) realizaram testes biológicos, paralelamente aos ensaios de alelopatia, com soluções de potenciais osmóticos conhecidos com o intuito de discriminar a interferência do potencial osmótico na inibição puramente alelopática. Estes autores utilizaram o Polietinoglicol (PEG-6000) para preparar as soluções com potenciais osmóticos. Altos valores de potenciais osmóticos são ideais para a germinação de sementes (Rutherford e Powrie, 1993) e extratos com potenciais osmóticos com valores iguais ou acima de 100 mOsmol (ou seja, mais negativo que -0,25 MPa) podem afetar a germinação de sementes independentemente da atividade alelopática (Leather e Einhellig, 1988).

Tabela 1.- Valores de potencial osmótico (MPa) dos extratos das espécies testadas coletadas em dois períodos distintos (chuvoso e seco).

Espécies	Potencial osmótico (MPa)	
	Período chuvoso	Período seco
<i>Anadenanthera falcata</i>	-0,141	-0,092
<i>Davilla elliptica</i>	-0,181	-0,132
<i>Diospyros hispida</i>	-0,104	-0,100
<i>Kielmeyera coriacea</i>	-0,195	-0,201
<i>Miconia albicans</i>	-0,128	-0,050
<i>Piptocarpha rotundifolia</i>	-0,129	-0,020
<i>Schefflera vinosa</i>	-0,183	-0,065
<i>Senna rugosa</i>	-0,138	-0,110
<i>Siparuna guianensis</i>	-0,207	-0,192
<i>Stryphnodendron polyphyllum</i>	-0,128	-0,080
<i>Xylopia aromatica</i>	-0,138	-0,115

No experimento com solução de PEG 6000 utilizou-se soluções de -0,1 e -0,2 MPa e os resultados de porcentagem e velocidade de germinação para as sementes

de alface foram respectivamente 90,83% e 0,88 dias⁻¹ (a -0,1 MPa) e 90,73% e 0,79 dias⁻¹ (a -0,2 MPa).

Para as sementes de gergelim os valores encontrados foram 95,83% e 0,91 dias⁻¹ com -0,1 MPa e 98,33% e 0,84 dias⁻¹ quando se utilizou -0,2 MPa. Esses dados não diferiram daqueles obtidos para o grupo controle de cada uma das espécies testadas (alface e gergelim). Assim, verifica-se que o potencial osmótico não afetou a germinação das sementes de alface e de gergelim nos potenciais testados, tornando mais evidente a presença de atividade alelopática nas espécies avaliadas.

Diante dos resultados obtidos para as sementes de alface sob influência dos 11 extratos de folhas coletadas em dois períodos distintos, pode-se observar que os extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* coletadas na estação seca causaram diminuição significativa na germinabilidade das sementes-alvo. A inibição causada pelos extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* foi de 75,9% e 63,4% respectivamente. Os demais extratos não alteraram significativamente a germinabilidade das sementes de alface (Figura 3).

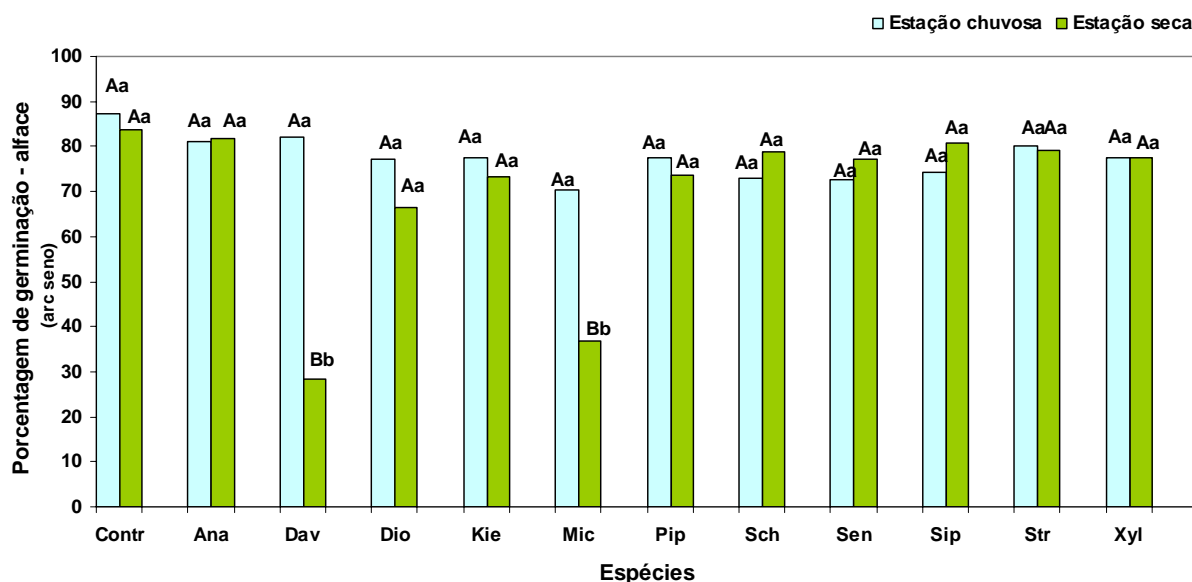


Figura 3 - Porcentagem de germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa*) germinadas sob influência de extratos aquosos de folhas na concentração de 10% p/v de espécies coletadas em áreas de cerrado: *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopia aromatica* (Xil). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as espécies e minúsculas para as estações (chuvosa e seca) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à velocidade de germinação das sementes de alface pode-se observar que todos os extratos provenientes de folhas coletadas em ambas as estações (chuvosa e seca) causaram atrasos significativos na velocidade destas sementes quando comparados com o controle. Nota-se ainda que os menores valores de velocidade de germinação foram obtidos com o uso dos extratos de *Davilla elliptica*, *Miconia albicans* e *Siparuna guianensis*. No entanto, na presença dos extratos de cinco espécies estudadas (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) a velocidade de germinação foi significativamente menor quando a coleta das folhas foi realizada no período seco, se comparado ao chuvoso (Figura 4).

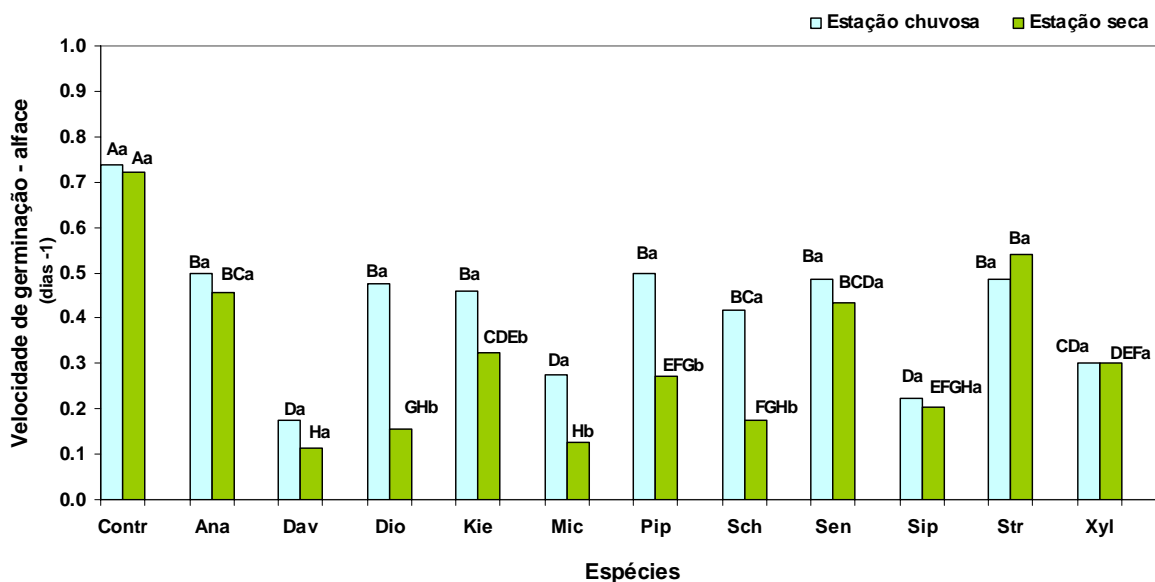


Figura 4 - Velocidade de germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa*) germinadas sob influência de extratos aquosos de folhas na concentração de 10% p/v de espécies coletadas em áreas de cerrado: *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopi aromatica* (Xyl). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as espécies e minúsculas para as estações (chuvosa e seca) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à germinação das sementes de gergelim não houve diferenças significativas quando comparados dois fatores na análise de variância (extratos e estação de coleta) e mesmo quando as médias totais foram comparadas separadamente também não houve diferenças estatísticas. Sendo assim, os dados

não foram apresentados, indicando que nenhum dos extratos testados das espécies alterou significativamente a porcentagem final de sementes de gergelim.

Para os valores de velocidade de germinação de sementes de gergelim, pode-se constatar que os extratos de folhas de *Anadenanthera falcata*, *Davilla elliptica*, *Siparuna guianensis* e *Xylopia aromatica* causaram atrasos na germinação quando foram utilizadas folhas provenientes das duas estações. No entanto, para extratos de cinco espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) atrasos na velocidade da germinação de gergelim apenas foram observados quando as folhas destas espécies foram coletadas na estação seca em comparação com os grupos controles (Figura 5).

Verifica-se ainda, que para os extratos de *Davilla elliptica*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa* os atrasos na germinação foram significativamente maiores utilizando folhas coletadas na estação seca, quando comparados com aquelas coletadas na estação chuvosa. Para as sementes de gergelim a menor velocidade de germinação foi obtida com extratos de *Siparuna guianensis* independente da época de coleta, enquanto que o único extrato que proporcionou valores menores de velocidade com folhas coletadas na estação chuvosa foi o de *Anadenanthera falcata* (Figura 5).

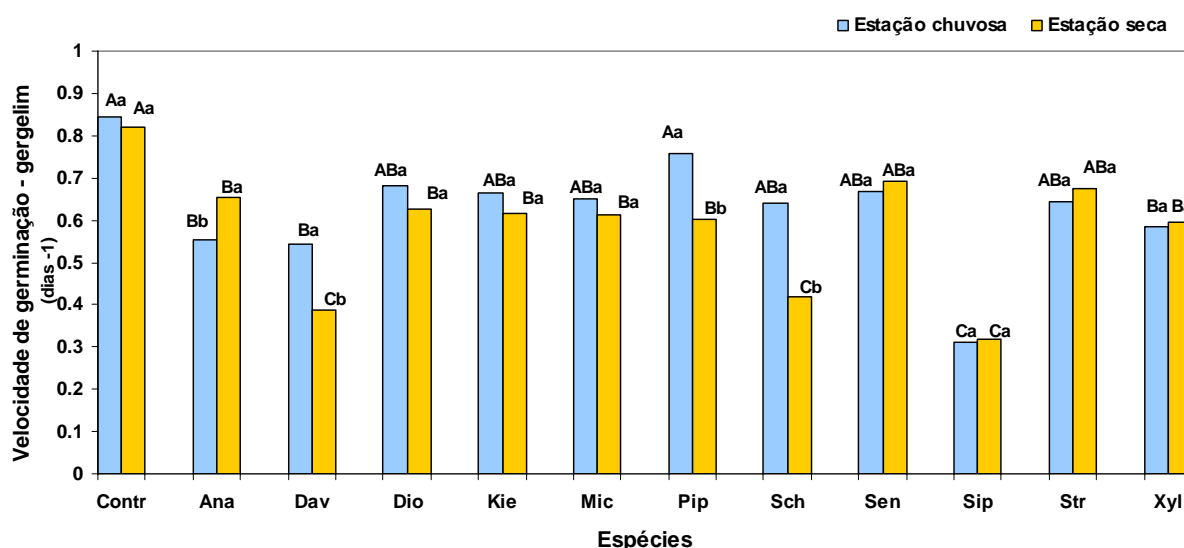


Figura 5 - Velocidade de germinação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) germinadas sob influência de extratos aquosos de folhas na concentração de 10% p/v de espécies coletadas em áreas de cerrado: *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopia aromatica* (Xyl). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as espécies e minúsculas para as estações (chuvosa e seca) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dentre as espécies estudadas pode-se verificar que extratos de *Davilla elliptica*, *Miconia albicans* foram os que inibiram significativamente a germinabilidade das sementes de alface, evidentemente quando a coleta das folhas destas espécies foi realizada no período seco.

Os extratos de cinco espécies estudadas (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) atrasaram a germinação das sementes de alface e gergelim, quando suas folhas foram coletadas no período de seca. Considerando que todas as espécies estudadas estavam submetidas aos mesmos tipos de estresse na área de coleta (temperatura, pluviosidade, nutriente, etc) pode-se dizer que as diferenças obtidas nos bioensaios frente a esses extratos, podem ser devidas às características genéticas de cada espécie. Para Larcher (2004) a seleção e coevolução das espécies, em resposta a fatores ambientais estressantes, resultaram na produção de uma grande variedade de substâncias de defesa nas plantas.

Assim como o ocorrido com as espécies *Davilla elliptica* e *Miconia albicans*, que causaram diminuição significativa na germinabilidade de sementes de alface (Figura 3), outros extratos de folhas de espécies de cerrado, *Machaerium acutifolium*, *Baccharis draccunculifolia*, *Casearia sylvestris* diminuíram também a porcentagem de sementes de alface (Povh *et al.*, 2007; Rozete *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2006) identificou que entre 15 espécies de cerrado avaliadas, quatro teriam potencial alelopático, são elas *Ouratea spectabilis*, *Qualea grandiflora*, *Pouteria ramiflora* e *Stryphnodendron adstringens*, sendo os extratos desta última foram os que provocaram maiores inibições quando comparados com os demais. No entanto, Barreiro (2005) utilizando folhas de *Stryphnodendron adstringens* também encontrou diminuição dos valores de velocidade de germinação, porém com o emprego de extratos mais concentrados e fervidos.

Dentre as espécies avaliadas neste trabalho, uma inibição mais acentuada foi registrada na velocidade de germinação do que na porcentagem (Figuras 3, 4 e 5). Extratos de *Eugenia dysenterica*, *Aristolochia esperanzae*, *Andira humilis*, *Solanum lycocarpum* e *Miconia albicans* também espécies de cerrado, causaram inibição mais significativa no tempo do que na porcentagem de germinação de diversas espécies (Gorla *et al.*, 1997; Gatti *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Periotto *et al.*, 2004; Giotto *et al.*, 2007).

Muitas vezes o efeito alelopático não se manifesta sobre a porcentagem de germinação, mas sobre a velocidade de germinação das sementes ou sobre outro parâmetro do processo (Ferreira, 2004). Este fator pode ter um significado ecológico, pois plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido (Jefferson e Pennachio, 2005) e como consequência podem ser mais suscetíveis a estresses e terem menor chance na competição por recursos. Os efeitos podem, ainda, ser sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do DNA, funcionamento dos mensageiros secundários, da respiração, conformação de enzimas e de receptores, resultando em alterações no padrão de germinação (Rizvi e Rizvi, 1992; Ferreira, 2004).

Os efeitos alelopáticos na germinação de sementes não devem ser fundamentados somente no número final de sementes germinadas. Além deste fator, a velocidade de germinação, a homogeneidade e a sincronia de germinação das sementes são fatores que expressam a taxa e o grau de organização ou desordem nas reações químicas que ocorrem nas sementes durante o processo germinativo e estes dados devem ser analisados juntamente com a germinabilidade das sementes (Santana *et al.*, 2006).

Aumentos nos valores de entropia informacional (ou sincronia) indicam alterações na sincronia nas reações metabólicas que ocorrem durante o processo germinativo (Labouriau, 1983).

Os valores de entropia obtidos para as sementes de alface foram significativamente maiores que o controle com o uso dos extratos de *Siparuna guianensis* e *Xylopia aromatica* tanto para folhas coletadas na estação seca quanto chuvosa. Os extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* originários apenas de folhas coletas na estação chuvosa apresentaram entropia significativamente maiores que o controle. Porém os extratos de quatro espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) apresentaram valores significativamente maiores apenas para folhas coletadas na estação seca. (Figura 6).

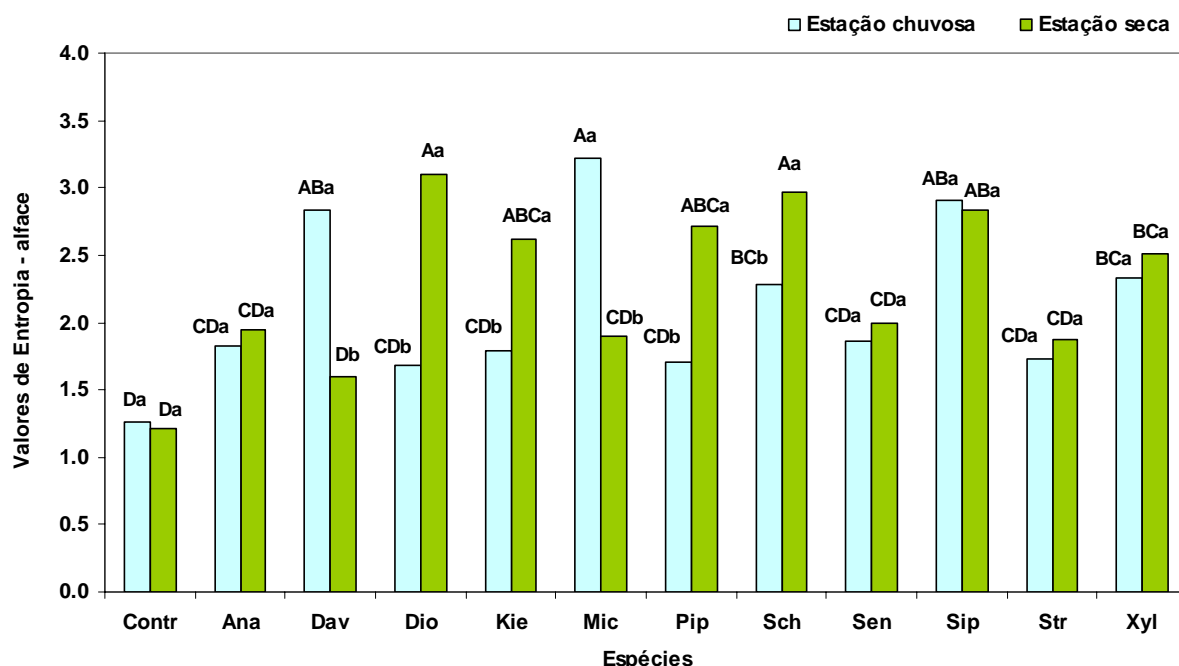


Figura 6 – Valores médios de entropia informacional de sementes de alfaca germinadas sob influência de extratos aquosos de folhas na concentração de 10% p/v de espécies coletadas em áreas de cerrado: *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopiya aromatica* (Xyl). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as espécies e minúsculas para as estações (chuvosa e seca) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos valores de entropia obtidos para as sementes de gergelim, verifica-se que os maiores valores foram obtidos quando as folhas de *Siparuna guianensis* foram coletadas em ambas as estações. No entanto, para os extratos das folhas de *Davilla elliptica* e *Schefflera vinosa* coletadas na estação seca também apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle (Figura 7).

Comparando-se os valores de entropia para os extratos de folhas coletadas nas estações chuvosa e seca, observa-se que para cinco espécies (*Davilla elliptica*, *Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans* e *Schefflera vinosa*) os valores da estação seca foram maiores que da chuvosa, indicando menor sincronia na germinação das sementes sob influência destes extratos (Figura 7).

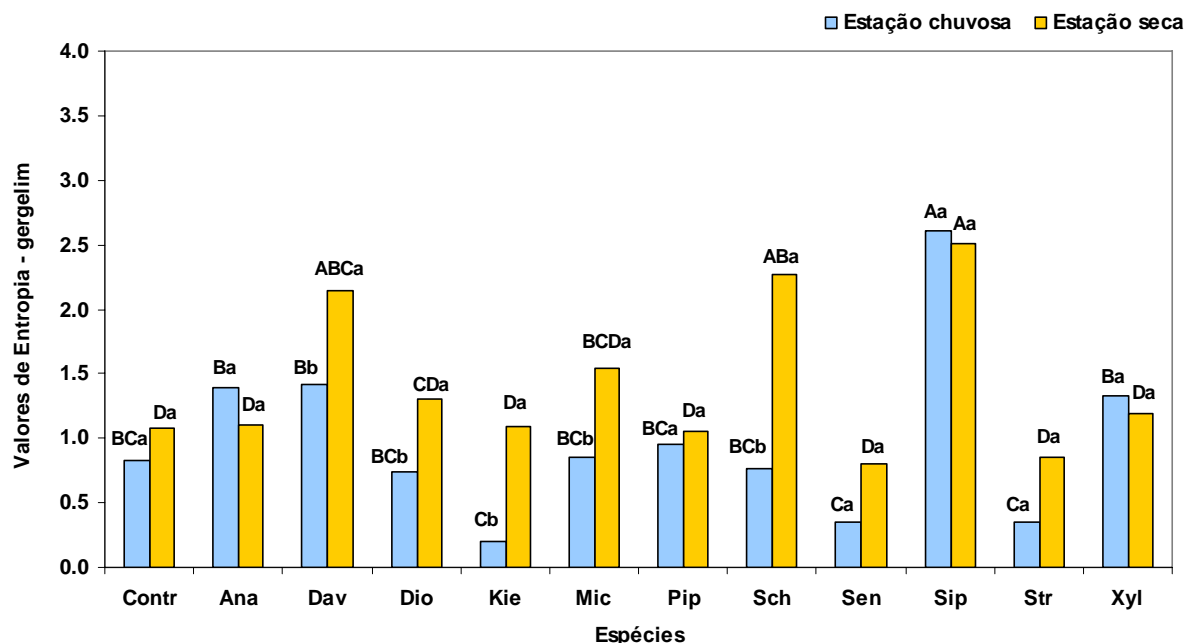


Figura 7 – Valores médios de entropia informacional de sementes de gergelim germinadas sob influência de extratos aquosos de folhas na concentração de 10% p/v de espécies coletadas em áreas de cerrado: *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopiya aromatica* (Xyl). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as espécies e minúsculas para as estações (chuvosa e seca) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando os gráficos de frequência relativa da germinação das sementes de alface (Figura 8A), observa-se que o grupo controle apresentou distribuição unimodal com pico um dia depois da embebição, indicando um grande número de sementes germinadas rapidamente e sincronia na germinação dessas sementes quando germinadas em água. Diferentemente do controle, sob a influência dos extratos de folhas coletadas na estação chuvosa pode-se observar que a distribuição das frequências relativas de germinação apresentou aspectos bimodais ou polimodais com picos deslocados para a direita, caracterizando um atraso no processo germinativo. Os valores máximos de germinação (maiores picos) podem ser observados ocorrendo aos 1,5 dias para três espécies (*Diospyros hispida*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Senna rugosa*) aos 2,0 dias para uma delas (*Kielmeyera coriacea*) e um maior deslocamento para a direita com picos aos 3,0 (*Xylopiya aromatica*) 5,0 (*Siparuna guianensis*) e 6,5 dias (*Davilla elliptica*) após a embebição (Figura 8A).

Em relação à influência dos extratos obtidos com folhas coletadas na estação seca (Figura 8B) na germinação de alface, pode-se observar que a distribuição das

freqüências relativas tem predominância polimodais. Além disso, verifica-se deslocamento dos picos de germinação para a direita com o uso de todos os extratos avaliados e alguns extratos proporcionaram o aparecimento de picos mais alargados, com presença de “ombros” ou “platôs”. As únicas espécies que apresentaram picos foi a *Stryphnodendron polyphyllum* e *Xylopia aromatica* com picos aos 1,5 e 2,5 respectivamente (Figura 8B).

Outra característica que indica atraso e falta de sincronia na germinação das sementes (utilizando extratos de folhas coletadas no período seco) é a presença de picos no 8º dia após a embebição, que pode ser observado para pelo menos cinco espécies (*Miconia albicans*, *Davilla elliptica*, *Diospyros hispida*, *Schefflera vinosa* e *Siparuna guianensis*) (Figura 8B).

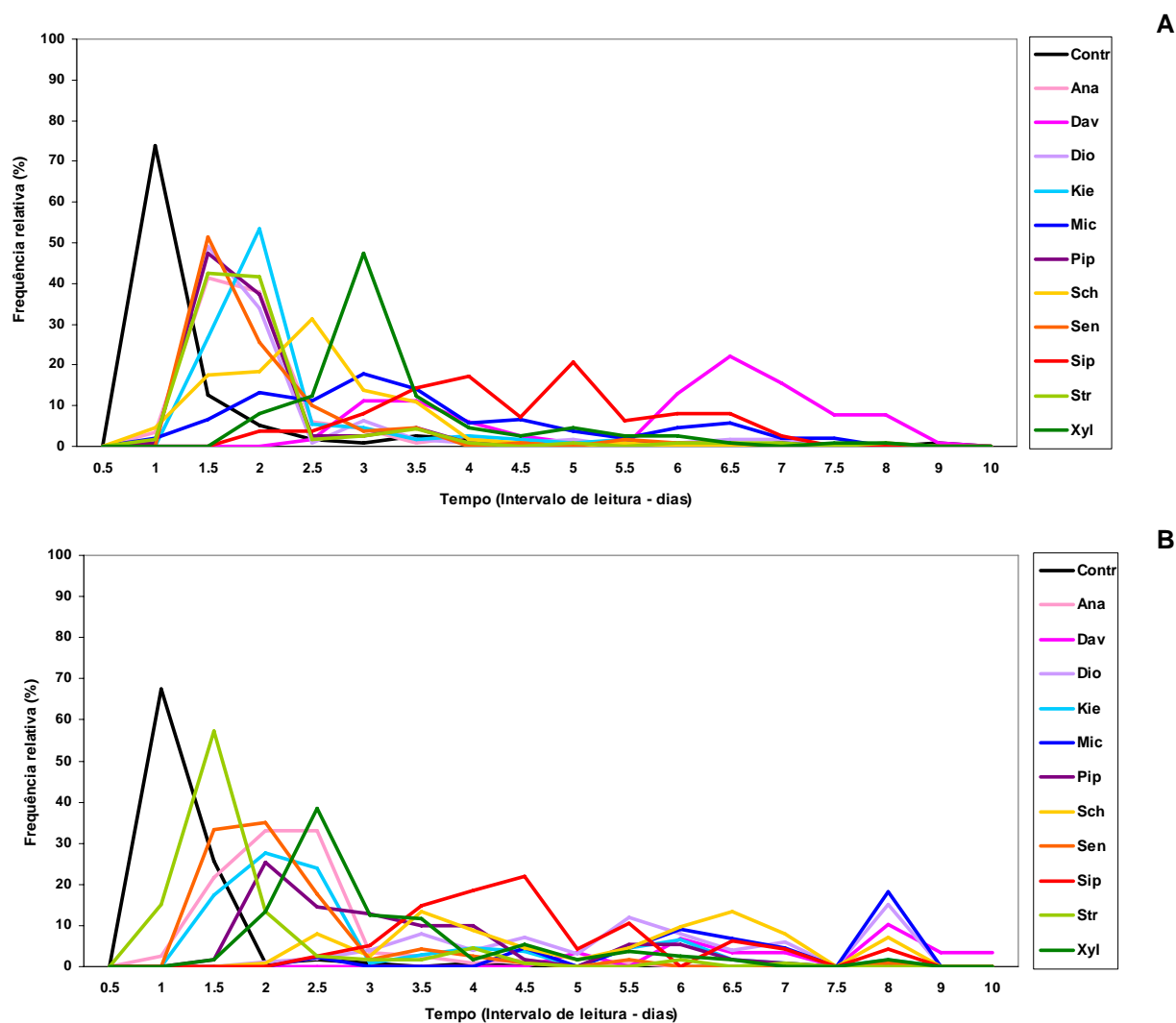


Figura 8 - Frequência relativa de germinação de sementes de alfaca sob influencia de extratos de folhas das espécies coletadas na estação chuvosa (A) e seca (B). *Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopia aromatica* (Xyl)).

Para as sementes de gergelim sob influência dos extratos obtidos com folhas coletadas na estação chuvosa verifica-se que a distribuição das frequências relativas, tem em geral, aspecto unimodal com maiores picos aos 1,5 dias do início da embebição, indicando atraso em relação ao grupo controle (1 dia). O uso do extrato de *Davilla elliptica* produziu aspecto bimodal nos gráficos de frequência relativa de germinação, com o primeiro pico registrado aos 1,5 dias após a embebição e o segundo aos 2,5 dias. Ainda pode-se observar que com o uso dos extratos de *Siparuna guianensis*, a germinação das sementes de gergelim aconteceu depois de 2º dia de embebição e se prolongou até os 5º dia (Figura 9A).

Em relação às sementes de gergelim sob influência dos extratos de folhas coletadas na estação seca verifica-se que, semelhante à estação chuvosa, também houve deslocamento do pico principal para a direita ocorrendo aos 1,5 dias após a embebição. No entanto, para os extratos de quatro espécies a distribuição se apresentou diferenciada com aparecimento de ombros (*Xylopia aromatica*), ausência de picos (*Schefflera vinosa*) e com aspecto polimodal (*Davilla elliptica* e *Siparuna guianensis*). Pode-se observar ainda que utilizando estes dois últimos extratos a germinação das sementes se estendeu até os 4,0 e 5,5 dias após a embebição, respectivamente para *Davilla elliptica* e *Siparuna guianensis*. (Figura 9B).

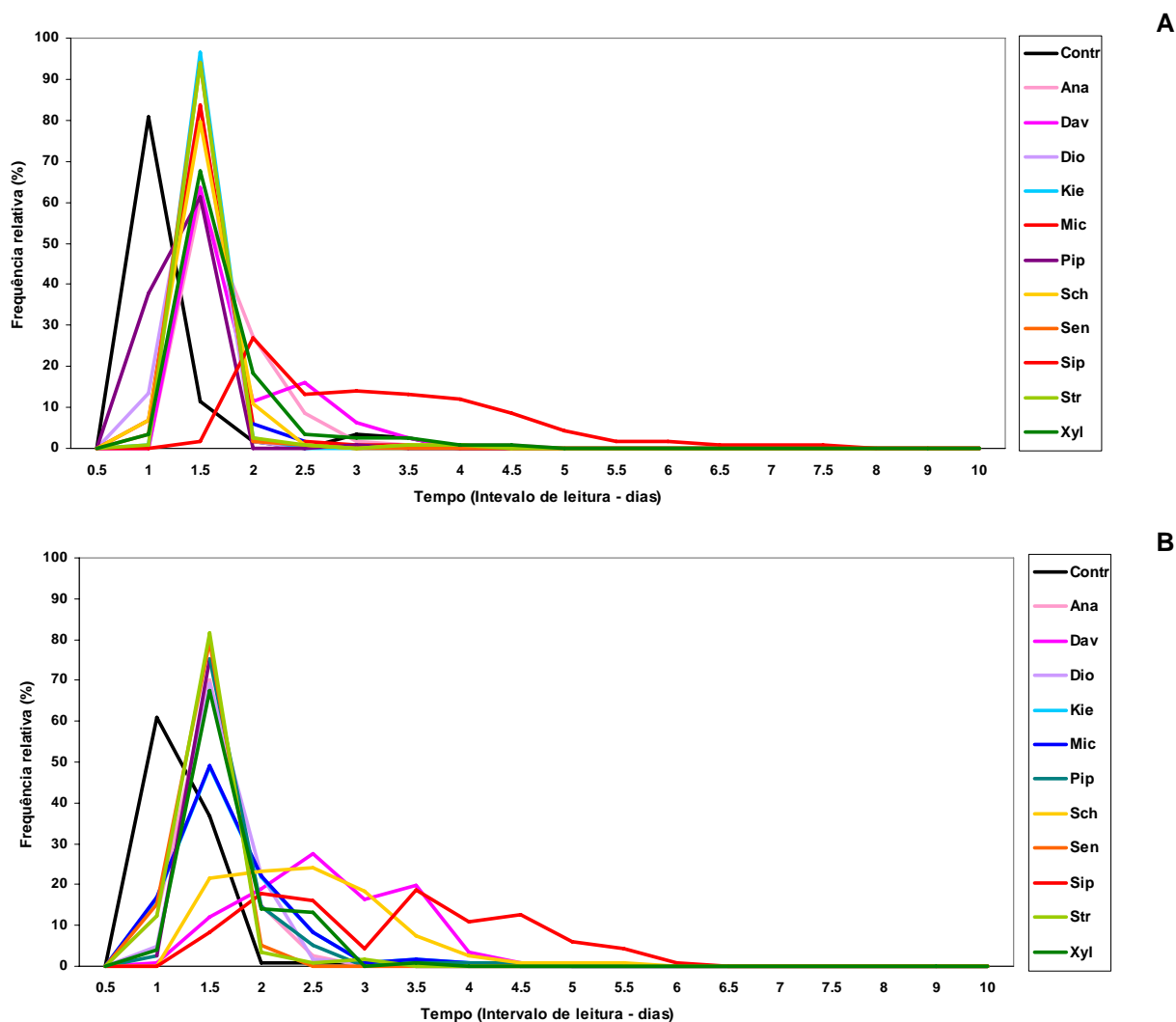


Figura 9 - Frequência relativa de germinação de sementes de gergelim sob influência de extratos de folhas das espécies coletadas na estação chuvosa (A) e seca (B). (*Anadenanthera falcata* (Ana), *Davilla elliptica* (Dav), *Diospyros hispida* (Dio), *Kielmeyera coriacea* (Kie), *Miconia albicans* (Mic), *Piptocarpha rotundifolia* (Pip), *Schefflera vinosa* (Sch), *Senna rugosa* (Sen), *Siparuna guianensis* (Sip), *Stryphnodendron polyphyllum* (Str), *Xylopiya aromatica* (Xyl)).

Diante dos resultados obtidos da distribuição das frequências relativas de germinação para as espécies de alface e gergelim, observa-se que a maioria dos extratos utilizados causou alterações nos processos germinativos destas sementes. Distribuições bimodais e polimodais além de deslocamento dos picos para direita no eixo 'x' dos referidos gráficos, demonstra que a germinação de alface e gergelim aconteceu mais tardiamente e menos sincronizada em relação aos grupos controles. Essas alterações nas curvas de distribuição das frequências relativas foram mais evidentes para a germinação das sementes de alface e os picos foram mais atrasados quando as folhas dos extratos foram coletadas na estação seca.

Neste trabalho, quando comparados o potencial alelopático de folhas das 11 espécies de cerrado coletadas nas estações seca e chuvosa, pode se verificar que a diminuições na porcentagem e atraso na velocidade de germinação de sementes de alface e gergelim foi mais evidente quando as folhas foram coletadas no período seco (Figuras 3 a 5). Além disso, em geral, com extratos provenientes de folhas coletadas no período de seca foram obtidos os maiores valores de entropia e distribuição mais distribuída no tempo de embebição, caracterizando menor sincronia na germinação das sementes (Figuras 6 a 9).

Este fato pode ser explicado, pois durante o período seco há um aumento na demanda evaporativa atmosférica e da incidência solar estando o solo sujeito a um déficit hídrico sazonal nas camadas mais superficiais (Haridasan, 2001; Franco, 2002). A estação seca é muito agressiva e em alguns casos pode durar até seis meses (Eiten, 1972), podendo representar um momento de estresse marcante para as plantas do cerrado (Sarmiento, 1996).

Condições de estresse de origem abiótica e biótica alteram a produção de aleloquímicos, e dentre elas, a umidade e temperatura são os fatores mais comuns. Além disso, enfatiza que condições ambientais estressantes modificam a taxa de produção dos aleloquímicos e podem aumentar a concentração destes compostos, assim proporcionando uma maior inibição nas plantas receptoras, o que se caracteriza por um importante mecanismo de defesa das plantas doadoras (Einhelling, 1999; 2004).

Alguns trabalhos comprovaram que condições de estresse para as plantas induzem a uma maior produção de aleloquímicos. Por exemplo, a planta *Helacleum lanatum* depois de permanecer cinco dias exposta a temperatura de 36°C produziu uma concentração de cumarina muitas vezes maior que antes da exposição à temperatura elevada (Blanco, 2007).

Segundo Chaves e Escudero (1999) o principal responsável pela variação de produção de flavonóides pelas plantas são os parâmetros climatológicos (responsáveis pelas diferenças sazonais). Para estes autores diferentes espécies de plantas podem utilizar rotas fisiológicas diferentes para acionar a produção de alguns flavonóides ou podem responder ao mesmo estímulo por produzir diferentes estruturas. Os flavonóides são encontrados em quase todas as plantas vasculares (Berhow e Vaughn, 1999) e sua produção pode ser induzida por estímulos exógenos, como mudanças na luz e temperatura (Hahlbrock e Scheel, 1989). Os

flavonóides parecem agir primeiramente na germinação e inibição do crescimento celular, possivelmente pela interferência no sistema de transferência de energia dentro das células (Moreland e Novitsky, 1988).

Além disso, ambientes em condições estressantes podem restringir o crescimento da planta e a taxa fotossintética, com isso acumular carboidratos não-estruturais. Esta pode ser uma das explicações para o aumento de substâncias defensivas a base de carbono, que são compostos derivados do metabolismo secundário (Chaves e Escudero, 1999). A confirmação deste balanço carbono/nutriente é que espécies que crescem em meios com baixa disponibilidade de nutrientes ou de água produzem altos níveis de taninos e fenóis (Bryan *et al.*, 1983; Waring *et al.*, 1985).

Tang (1995) reportou que diferentes quantidades de metabólitos secundários são frequentemente encontradas em plantas que crescem em habitat pobre de nutrientes se comparada quando crescem em solos mais ricos.

Taninos e compostos fenólicos têm uma grande importância na proteção das plantas contra ataque de herbivoria ou de microrganismos e proporcionam aumento na habilidade de certas espécies competirem com outras em seus ambientes (Rice, 1984).

As plantas raramente estão expostas a um único estresse (Einhellig, 1999), sendo assim, além da menor disponibilidade de água nas camadas mais superficiais e da alta incidência solar durante o período seco nos cerrados, outros fatores possivelmente estão interagindo neste ambiente. Tais interações podem ser processos de competição, ação dos microrganismos, queimada decorrente desta época e deciduidade das folhas que são influenciadas pela sazonalidade.

Diferente da alelopatia (a qual se define pela liberação de substâncias no ambiente) a competição acontece quando as plantas exploram um recurso escasso. A competição interespecífica é claramente influenciada por condições geoclimáticas e segundo Blanco (2007), as plantas podem responder com dois tipos diferentes de estratégias: uma onde ocorre um rápido crescimento e assim ocupam melhor seu espaço (e como consequência melhoram suas chances de obter novos recursos) e outra onde as plantas conseguem sobreviver com baixos níveis de recursos. Em adição a estas duas estratégias e com a finalidade de agilizar a competição por recursos, as plantas podem utilizar uma interferência passiva no desenvolvimento de seus competidores pela liberação de aleloquímicos (Reigosa, 1999; Blanco, 2007).

A alelopátia pode ter função importante em ambientes áridos porque os aleloquímicos persistem no solo por longos períodos se comparados com ambientes úmidos, por este fator, a alelopátia pode ser aumentada por combinar os impactos da baixa umidade e estresse dos aleloquímicos (Einhellig, 1999). Em ecossistemas onde as queimadas são freqüentes foi constatado que a produção de aleloquímicos foi aumentada pelas plantas e esta produção pode ser consequência dos danos físicos causados pelo fogo. Por outro lado, o fogo é um importante fator para reduzir a concentração de aleloquímicos nos solos naturais, queimando o húmus e os detritos caídos das plantas que possuem alta concentração de inibidores de crescimento (Williamson *et.al*, 1992).

Estresse é em geral definido como um fator externo, que exerce uma influencia desvantajosa sobre a planta. O conceito de estresse está intimamente relacionado ao de tolerância que é a aptidão de planta para enfrentar um ambiente desfavorável (Orcutt e Nilsen, 2000). No entanto, um ambiente estressante para uma planta pode não ser para outra. Se uma planta pode reduzir o crescimento de plantas vizinhas pela liberação de compostos químicos no solo, isso pode ter como consequência a maior chance de acesso à luz, à água e aos nutrientes e, portanto, propiciar sua maior adaptação evolutiva.

Dentre as espécies estudadas pode-se verificar que extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* foram os que inibiram significativamente a germinabilidade das sementes de alface, evidentemente quando a coleta das folhas destas espécies foi realizada no período seco. Os extratos destas mesmas espécies também proporcionaram atrasos significativos na velocidade de germinação de alface, porém estes atrasos foram menores para as sementes de gergelim, indicando que as sementes de alface foram mais sensíveis aos extratos analisados se comparadas com as de gergelim.

Pode-se observar ainda que extratos provenientes de folhas coletadas no período seco apresentaram maior inibição na velocidade de germinação das sementes de alface se comparado ao período chuvoso para cinco espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*). Além disso, para os extratos destas mesmas cinco espécies somente houve atraso na germinação de sementes de gergelim quando a coleta foi realizada no período seco em relação ao grupo controle.

Sendo assim, pode-se inferir que as diferenças obtidas nos testes de alelopátia deste trabalho, utilizando extratos das plantas do cerrado com folhas coletadas no período chuvoso e de seca, podem ser devido às plantas estarem expostas a alterações climáticas ou outros tipos de estresse e conseqüentemente induzirem uma maior produção de aleloquímicos causando assim variações nas respostas das atividades biológicas analisadas. Além do fator limitante água no solo e na atmosfera as plantas podem sofrer a interferência das substâncias produzidas pelas plantas vizinhas. Esta resposta diferenciada de certas espécies frente a fatores estressantes, num ambiente tão complexo como o cerrado, pode garantir o estabelecimento e permanência de certas espécies em prejuízo de outras.

Conclusões

Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando os diferentes extratos de espécies do cerrado coletados em estações seca e chuvosa pode-se concluir que:

- Extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* foram os que inibiram significativamente a germinabilidade das sementes de alface, quando a coleta das folhas destas espécies foi realizada no período seco.

- Extratos de cinco espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) atrasaram a germinação das sementes de alface e gergelim, quando suas folhas foram coletadas no período de seca.

Desta forma, pode-se concluir que para as espécies estudadas, em geral houve maior atividade alelopáticas com o uso de extratos de folhas coletadas no período da seca.

Referências Bibliográficas

- BARREIRO, A.P.; DELACHIAVE, M.E.A.; SOUZA, F.S. (2005). Efeito alelopático de extratos de parte aérea de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] na germinação e desenvolvimento da plântula de pepino. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8 (1):4-8.
- BERHOW, M.A.; VAUGHN, S.F. (1999). Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. p. 423-438. In: INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., FOY, C.L. (eds). *Principles and Practices in Plant Ecology – Allelochemical Interactions*. CRC Press, 551p.
- BIOESTAT 5.0 – *Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. (2007). Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Pará, Brasil, (www.mamiraua.org.br).
- BLANCO, J.A. (2007). The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecological Modelling*, 209 (2-4):65-77.
- BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S.; KLEIN, D.R. (1983). Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40 (3): 357-368.
- CHAVES, N.; ESCUDERO, C. (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors p.267-285. In: INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., FOY, C.L. (eds). *Principles and Practices in Plant Ecology – Allelochemical Interactions*. CRC Press, 551p.
- CHOU, C.H. (1986). The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. p. 57-73. In: PUTNAM, A.R. e TANG, C.S. *The science of allelopathy*. New York: John Wiley e Sons. 317p.
- CHOU, C.H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(5): 609-636.
- COUTINHO, L.M. (2006). O conceito de Bioma. *Acta Botanica Brasilica*, 20:(1),13-23.
- DURIGAN G., BAITILO, J.B., FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. (2004). *Plantas do cerrado paulista. Imagens de uma paisagem ameaçada*. Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Páginas & Letras Ed., 475p.
- DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. (1993). *Noções sobre a alelopatia*. Jaboticabal: FUNEP, 28 p.
- EINHELLIG, F.A. (1996). Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal*, 88: 886-893.
- EINHELLIG, F.A. (1999). An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses p. 479-494. In: INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., FOY, C.L. (eds). *Principles and Practices in Plant Ecology – Allelochemical Interactions*. CRC Press, 551p.

- EINHELLIG, F.A. (2004). Mode of allelochemical action of phenolic compounds. p.217-238. *In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals.* Washington: CRC Press, 372p.
- EITEN, G. (1972). The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review.* 38: 201-341.
- EMBRAPA - *Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo. Estação Meteorológica*
<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/dados-meteorologicos/>
- FERREIRA, A.G. (2004). Interferência: competição e alelopatia. p. 251-262. *In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs). Germinação do básico ao aplicado,* Porto Alegre: Artmed. 323p.
- FERREIRA, A.G. (2005). Alelopatia: sinergismo e inibição. p. 433-440. *In Nogueira, R.J.M.C.; Araújo, E.L.; Willadino, L.G.; Cavalcante, U.M.T. (eds). Estresses Ambientais: danos e benefícios em plantas.* Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 500p.
- FERRI, M.G. (1969). *Plantas do Brasil e do cerrado.* São Paulo: Edgard Blücher, 239p.
- FRANCO, A.C. (2002). Ecophysiology of woody plants. p.178-197. *In: P.S. Oliveira; R.J. Marquis (Eds.). The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna.* Columbia University Press, Irvington, USA.398 p.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. (2004). Atividade Alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasílica*, 18 (3):459-472.
- GIOTTO, A.C.; OLIVEIRA, S.C.C.; SILVA, J.G.P. (2007). *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 600-602.
- GORLA, C.M.; PEREZ, S.C.J.G.A. (1997). Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2):261-266.
- HAHLBROCK, K.; SCHELL, D. (1989). Physiology and biochemistry of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 347-369.
- HARIDASAN, M. (2001). Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. p. 68-83. *In: McClain, M.E., Victoria, R.L; Richey, J.E. (eds.). Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world.* Oxford University Press, New York. 365p.
- JACOBI, U.S.; FERREIRA, A.G. (1991). Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, 26(7): 935-943.
- JEFFERSON, L.V.; PENNACHIO, M. (2005). Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. *Journal of Arid Environments*, 55:275-285.

- JELLER, H; PEREZ, S.C.J.G.A. (2001). Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de geberelina em sementes de *Senna spectabilis*. *Ciência Florestal*, 11(1): 93-104.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1:147-155.
- LABOURIAU, L.G. (1983). *A germinação de sementes*. Washington: OEA. 175p.
- LABOURIAU, L.G.; OSBORN, J.H. (1984). Temperature dependence on the germination of tomato seeds. *Journal of Thermal Biology*, 9(44): 285-294.
- LARCHER, W. (2004). *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p.
- LEATHER, G.R.; EINHELLIG, F.A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal Chemical Ecology* 14: 1821-1827.
- LORENZI, H. (2002). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 4nd Ed. Nova Odessa: Editora Plantarum. 368 p.
- MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. (1998). Alelopátia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(8): 1261-1270.
- MORELAND, D.E.; NOVITZKY, W.P. (1988). Interference by flavone and flavonols with chloroplast-mediated electron transport and phosphorylation. *Phytochemistry*, 27(11): 3359-3366.
- OLIVEIRA, C.C.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (2004). Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extracts on sesame seed germination and seedling growth. *Allelopathy Journal*, 13:201-209.
- ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. (2000). *The Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors*. John Wiley and Sons, 684p.
- PAESE, A. (1997). "Caracterização e Análise Ambiental do Campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP". Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos. 1997.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasílica*, 18:425-430.
- POVH, J.A.; PINTO, D.D.; CORRÊA, M.O.G.; ONO, E.O. (2007). Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 447-449.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science* 18(5): 577-608.
- RICE, E. L. (1984). *Allelopathy*. New York: Academic Press, 423 p.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (1992). *Allelopathy: basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall. 480 p.

- ROZETE, F.S.S.; OLIVEIRA, P.A.; GUSMAN, G.S.; VALENTIM, J.M.B.; VESTENA, S.; BITTENCOURT, A.H.C. (2007). Avaliação do Efeito alelopático de extratos aquosos de *Bacharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleraceae* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 513-515.
- RUTHERFORD, M.C.; POWRIE, L.W. (1993). Allelochemic control of biomass allocation in interaction shrub species. *Journal of Chemical Ecology*, 19(5): 893-906.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.V.; SILVA, R.M.G. (2006). Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. *Allelopathy Journal*, 17(1): 43-52.
- SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. (2003). Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Revista Ciência Agronômica* 34 (1): 5-11.
- SARMIENTO, G. (1996). Biodiversity and water relations in tropical savannas p. 61-75. In: SOLBRIG, O.T., MEDINA, E., SILVA, J.F. (eds). *Biodiversity and savanna ecosystem processes: a global perspective*. Springer-Verlag, Berlin, 233p.
- SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A.; PETROVIK, P.R. (2003). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFSC.
- SILVA JR, M.C. (2005). *100 árvores do cerrado: guia de campo*. Brasília: Editora rede de Sementes do Cerrado. 278p.
- SILVA, G.B.; MARTIM, L.; SILVA, C.L.; YOUNG, M.C.M.; LADEIRA, A.M. (2006). Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Hoehnea* 33(3): 331-338.
- SOUSA, F.G.; DENARDIN, R.B.N.; MOURA, N.F.; DREVS, S. (2007). Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. *Allelopathy Journal* 20 (1): 195-202.
- TANG, C.-H; CAI, W.F.; KOHL, K.; NISHIMOTE, R.K. (1995). p. 142-157. Plant stress and allelopathy. In: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; Einhellig, F.A. (eds). *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications*. Washington; American Chemical Society, 381p.
- VILLELA, F.A. DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. (1991). Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26:1957-1968.
- WARING, R.H.; McDONALD, A.J.S.; LARSSON, T.; WIREN, A.; ARWIDSSON, E.; LOHAMMAR, T. (1985). Differences in chemical composition of plant growing at constant relative growth rates with stable mineral nutrition, *Oecologia*, 66(2): 157-160.
- WILLIAMSON, G.B.; RICHARDSON, D.R.; FISCHER, N.H. (1992). Allelopathic mechanism in fire-prone communities. p. 59-75. In: RIZVI, S.J.H., MISHRA, G.P.; RIZVI, V. *Allelopathic: basic and applied aspects effects*. 1nd Ed. London: Chapman & Hall. 480 p.

“ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *ARISTOLOCHIA ESPERANZAE* O.KUNTZE SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES, O CRESCIMENTO DE RAIZ E DE SUAS CÉLULAS XILEMÁTICAS EM PLÂNTULAS DE *SESAMUM INDICUM* L. “

RESUMO – (Alelopatia de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze sobre a germinação de sementes, o crescimento de raiz e de suas células xilemáticas em plântulas de *Sesamum indicum* L.). *Aristolochia esperanzae* é uma planta trepadeira ocorrente no sudoeste do cerrado brasileiro. Este trabalho teve como objetivo identificar se extratos de *A. esperanzae* interfeririam na germinação e no crescimento de plantas jovens de gergelim e em suas células xilemáticas. Extratos de folha e caule foram utilizados nas concentrações de 5 e 10% e o de raiz nas de 5, 7,5 e 10% (p/v peso fresco / volume). Foram analisadas a germinação de sementes, o crescimento das plântulas, as células xilemáticas das raízes de gergelim e também a possibilidade de recuperação das plântulas transferidas para a água após a permanência de dois dias nos extratos de *Aristolochia esperanzae*. Pode-se verificar que os diferentes extratos (folha, caule e raiz) causaram alterações na germinação das sementes e no crescimento das plântulas de gergelim. Dentre os extratos utilizados, os de raízes foram os que mais inibiram a germinação e o crescimento de gergelim, provocando alterações morfológicas e diminuição no crescimento e desenvolvimento das plântulas, sendo que na concentração de 10% houve supressão total da germinação. As plântulas de gergelim quando retiradas da presença dos extratos não recuperaram seu crescimento de parte aérea e da raiz, em relação ao grupo controle. Os extratos de *Aristolochia esperanzae* causaram diminuição de 50% do tamanho de células xilemáticas, alterações na raiz primária e no número de raízes secundárias de gergelim. Extratos aquosos de *A. esperanzae* têm efeito alelopático sobre o desenvolvimento de gergelim.

Palavras-chave: xilema, cerrado, inibição do crescimento de raiz.

ABSTRACT – (Seed germination, growth and root xylem cells of *Sesamum indicum* L. under influence of *Aristolochia esperanzae* extracts). *Aristolochia esperanzae* is a climber plant which occurs at southwest Brazilian savanna region. The objectives of this work were identified if aqueous extracts of *A. esperanzae* affect the germination and the growth of seedlings of sesame. Leaf and shoot extracts had prepared at concentrations of 5 and 10% and root at 5; 7,5 and 10% (p/v fresh weight / volume). It was analyzed the growth, the germination, the root xylem cells and the possibility of seedling growth recovery when transferred to water, after it had been submitted during two day to the extracts of *A. esperanzae*. It was verified that the different extracts (leaf, shoot and root) promoted changes in the germination and seedling growth. Among the extracts prepared, the great inhibition was produced by

root extracts. It was also observed morphological alterations and a decrease on the growth and seedling development. Total suppression of germination was found with the use of root extract at 10%. Means values of aerial part had not been reversed when the growth was contrasted with control group. The extracts of *A. esperanzae* provoked a decrease of 50% in the size of root xylem cells, changes in the primary root and in the number of secondary roots of sesame. Aqueous extract of *A. esperanzae* has allelopathic effect on germination and development of sesame seedlings

Key-words - xylem, allelopathy, root growth inhibition, savannah.

Introdução

A alelopátia é definida como uma influência benéfica ou prejudicial, exercida por substâncias liberadas no ambiente pelas plantas, que podem alterar o crescimento e o desenvolvimento de plantas vizinhas ou de microrganismos. Os aleloquímicos podem estar presentes em todos os órgãos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caule, e sementes (Miller, 1983; Putnan e Tang, 1986), alguns dos quais têm potencial para armazenar estes compostos, porém a quantidade e a via como são sintetizados e emitidos diferem de espécie para espécie (Friedman, 1995).

Efeitos inibitórios tipicamente alelopáticos resultam da ação combinada de grupos de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos (Einhellig, 1996) alterando o padrão de crescimento das plantas (Yokotani-Tomita *et al.*, 1998; Parvez *et al.*, 2004; Kil e Shim, 2006). Na maioria das vezes, os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, são estimulantes, quando em concentrações menores (Rice, 1984). Os mecanismos de ação dos aleloquímicos podem afetar os processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura estomática, nível de fitormônio, disponibilidade de mineral, a divisão e alongamento celular, estrutura e a permeabilidade de membranas e paredes celulares; (Einhellig, 1986; Inderjit e Dakshini, 1995; Chou, 1999; Reigosa *et al.*, 1999).

Em muitos trabalhos, as raízes se mostraram mais sensíveis aos aleloquímicos se comparadas com a parte aérea das plântulas (Bagchi *et al.*, 1997; Hamdi *et al.*, 2001; Parvez *et al.*, 2003; Oliveira e Campos, 2006; Punjani *et al.*, 2006; Rahman, 2006; Ercoli *et al.*, 2007). A inibição do crescimento e desenvolvimento de raízes, decorrente da ação dos aleloquímicos, pode ser devida a mudanças na síntese de DNA de células do meristema apical radicular, alteração no metabolismo mitocondrial (Abrahim *et al.*, 2000) ou nos índices mitóticos celulares (Dayan *et al.*, 1999; Jacobi e Fleck, 2000; Romagni *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2001; Iganci *et al.*, 2006).

Kaur *et al.* (2005) demonstraram que o ácido benzóico causou irregularidades nas células radiculares, as quais se mostraram desorganizadas, inibindo o

crescimento de raízes de mostarda. Células das pontas de raízes de *Phaseolus vulgaris* também se apresentaram reduzidas e compactadas quando as plântulas da espécie cresceram sob influência de extratos aquosos de *Sicyos deppei* (Cruz-Ortega *et al.*, 1998). Modificações morfológicas são sinalizações de mudanças anteriores que ocorreram em nível celular e molecular (Ferreira e Áquila, 2000). Alterações nas membranas celulares podem ser consideradas os primeiros efeitos causados pelos aleloquímicos, os quais poderão desencadear mudanças nos chamados efeitos secundários (Barkosky *et al.*, 2000).

Aristolochia esperanzae O. Kuntze conhecida popularmente por papo-de-peru e mil-homens, é uma espécie pioneira e considerada a mais freqüente dentre as aristoloquias do gênero nos cerrados do estado de São Paulo. Esta espécie ocorre no centro-nordeste de São Paulo, oeste de Minas Gerais, sul de Goiás, oeste de Mato Grosso do Sul, nordeste, centro e sul do Paraguai, nordeste da Argentina e sul da Bolívia (Capellari, 1991) (Figura 1).

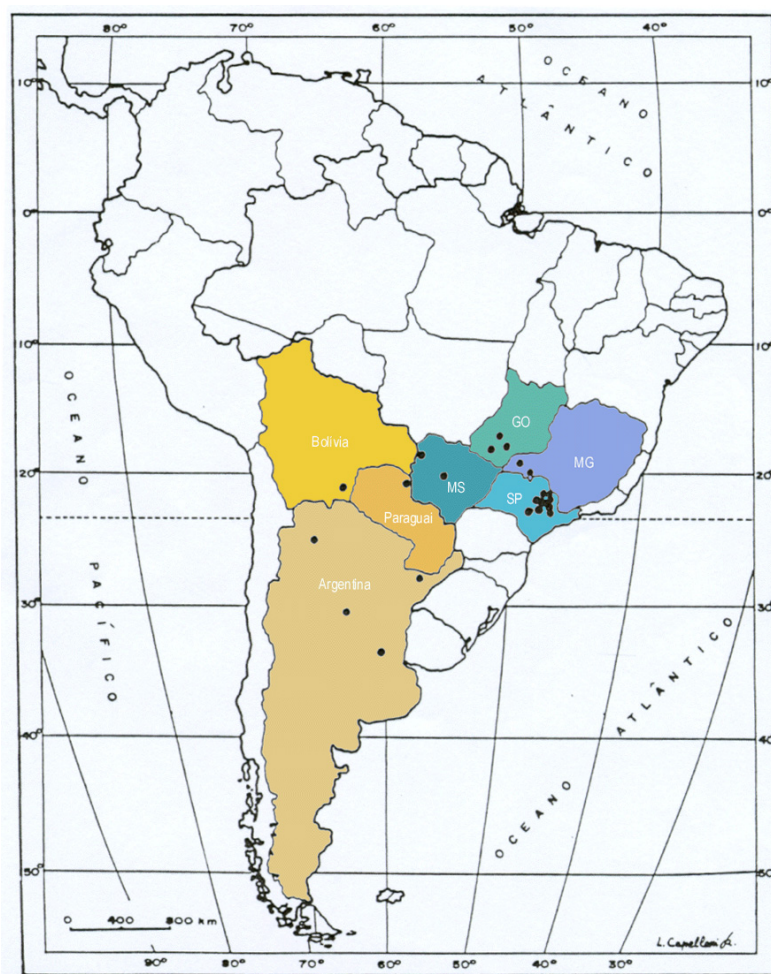


Figura 1 - Mapa de distribuição geográfica de *Aristolochia esperanzae* (modificado de Capellari, 1991).

Alguns trabalhos evidenciaram a presença de terpenos, diterpenos, lignanas e ácido aristolóquio em espécies de aristoloquias, incluindo-se *A. esperanzae* (Priestap *et al.*, 1971; Lopes *et al.*, 1988; Lopes e Bolzani 1988). Extratos de caule e raiz de plantas de *A. esperanzae* causaram anormalidades e inibição do crescimento de raízes de plântulas de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus* (Gatti *et al.*, 2004).

A maioria dos trabalhos em alelopatia direciona seus estudos para as espécies invasoras e de interesse agrícola, ou ainda na identificação e no isolamento de substâncias com potencial para uso como herbicidas. Pouco se sabe sobre as interferências alelopáticas em biomas, como o cerrado, o qual vem sofrendo rápida degradação. Além disso, a sucessão de espécies pode ser afetada pela alelopatia, permitindo a permanência de espécies pioneiras graças à liberação de aleloquímicos (Reigosa *et al.*, 1999). Porém, os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas e, por este motivo, torna-se difícil sintetizar o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996). Muitos trabalhos de alelopatia mostram alterações na germinação e no crescimento de plântulas-alvo, mas são poucos os estudos que evidenciam a fisiologia e o modo de ação dos aleloquímicos (Reigosa *et al.*, 1999; Inderjit e Duke, 2003).

Objetivos

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram identificar quais os órgãos de *Aristolochia esperanzae* cujos extratos interferem na germinação de sementes de gergelim, se há reversibilidade do fenômeno e se este altera a morfologia das plântulas da espécie-alvo.

Material e métodos

Material vegetal

Folhas, caules e raízes de *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze (Aristolochiaceae) foram coletados no campus da Universidade Federal de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. O material vegetal, após a coleta, foi mantido congelado até a preparação dos extratos.

Espécie estudada

Aristolochia esperanzae O. Kuntze, espécie pertencente à família Aristolochiaceae, planta herbácea, rastejante ou trepadeira, com folhas alternadas membranosas orbiculares-reniformes, glabras. Suas flores são zigomorfas com perianto formando um grande papo encimado por tubo bilabiado, totalmente pintalgada em tons marron-avermelhados mesclados com outras cores mais claras e exala odor de carne podre que atrai insetos (Figura 2). Esta espécie é conhecida popularmente por papo-de-peru, cachimbo-de-turco, mil-homens e jarrinha (Ferri, 1969).

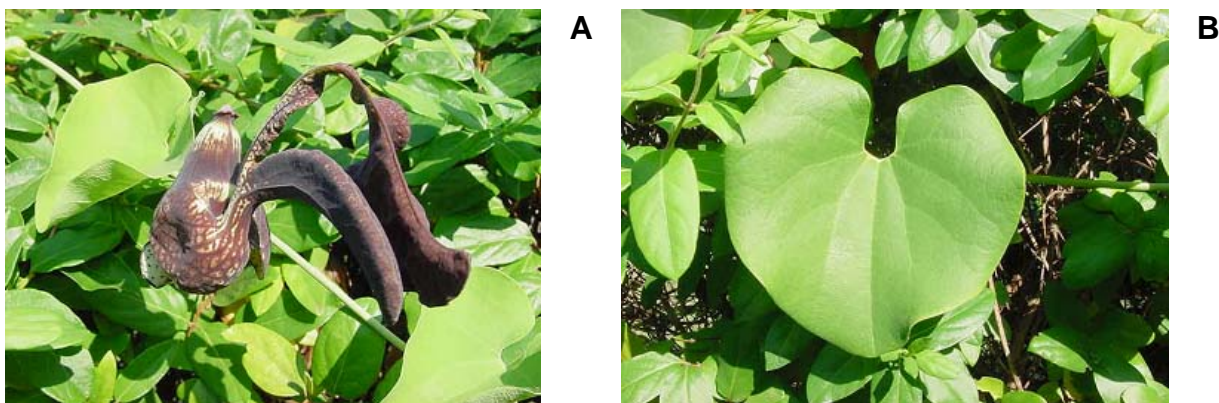


Figura 2 - Flor (A) e folha (B) de *Aristolochia esperanzae*

Extratos aquosos

O material vegetal foi pesado, triturado com água destilada em liquidificador industrial e, em seguida, os extratos foram deixados decantar durante três horas em geladeira no escuro. Decorrido este período, o extrato foi filtrado, utilizando-se uma bomba a vácuo acoplada a um funil de Buchner, recoberto com papel de filtro qualitativo, e imediatamente utilizado. Os extratos foram preparados nas concentrações de 5 e 10% de peso/volume (g/mL) de material fresco. A espécie-alvo utilizada para os bioensaios foi o gergelim (*Sesamum indicum* L., Pedaliaceae) e, os efeitos dos extratos de folha, caule e raiz de *Aristolochia esperanzae* foram comparados com os resultados do grupo controle (água destilada).

Nos bioensaios de germinação, crescimento, reversibilidade e para os estudos anatômicos foi utilizada também a concentração 7,5% de extratos de raiz de *Aristolochia esperanzae*, uma vez que na presença de extratos na concentração de 10% não houve germinação nem desenvolvimento de plântulas.

Bioensaio de germinação

Neste experimento foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro), forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL de extrato (ou água destilada), onde foram distribuídas 30 sementes de gergelim por placa. Os extratos de *A. esperanzae* utilizados neste bioensaio foram preparados nas concentrações de 5 e 10% p/v para folha, caule e raiz. Para o extrato de raiz também foi utilizada a concentração 7,5% p/v.

As placas contendo as sementes foram mantidas em câmaras B.O.D. climatizadas a 28°C (± 2) com 12 h de fotoperíodo. As contagens foram realizadas em intervalos de 12 horas durante os sete primeiros dias e, em intervalos de 24 h até totalizar dez dias após a semeadura. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular. Os parâmetros analisados foram porcentagem e velocidade de germinação (Labouriau, 1983; Borghetti e Ferreira, 2004). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 30 sementes para cada tratamento.

Bioensaio de crescimento

Para o bioensaio de crescimento foram utilizadas caixas plásticas transparentes (12,5 x 18 x 6,0 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 18 mL de extrato (ou água), tampadas e acondicionadas em sacos plásticos transparentes. As sementes de gergelim utilizadas neste bioensaio foram previamente germinadas em água (2 a 4 mm de radícula) e, posteriormente foram distribuídas nas caixas plásticas mantidas em câmara climatizada a 28°C (± 2) e fotoperíodo de 12 h. Cada caixa umedecida com 18 mL de extrato (ou água) recebeu 10 sementes previamente germinadas. Após quatro dias nessas condições foram feitas as medidas de parte aérea e comprimento das raízes primárias com um paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 10 plântulas para cada tratamento.

Bioensaio de recuperação

Para o bioensaio de recuperação foram utilizadas caixas plásticas transparentes (12,5 x 18 x 6,0 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 18 mL de extrato (ou água), tampadas e acondicionadas em sacos plásticos transparentes. As sementes de gergelim utilizadas neste bioensaio foram previamente germinadas em água (2 a 4 mm de radícula) e, posteriormente foram distribuídas nas caixas plásticas mantidas em câmara climatizada a 28°C (± 2) e fotoperíodo de 12 h. Cada caixa umedecida com 18 mL de extrato (ou água) recebeu 10 sementes previamente germinadas.

Utilizando o procedimento acima, foram montados dois grupos de caixas contendo as plântulas (em presença dos extratos ou água), e após decorridas 48 h as plântulas de um grupo foram transferidas para caixas contendo água destilada (assim como o controle que estava em água destilada). A outra metade das plântulas foi transferida para caixas contendo os mesmos extratos nas mesmas concentrações em que se encontravam. Sendo assim, obteve-se um grupo de plântulas que permaneceu 2 dias em presença dos extratos + 5 dias em presença de água, e outro grupo que permaneceu 7 dias em presença dos extratos.

No 7º dia foram avaliados os comprimentos da parte aérea e radicular das plântulas com um paquímetro digital, além da porcentagem de plântulas com raízes secundárias (PPRS), número médio de raízes secundárias em cada raiz primária (NRS/RP) e o tamanho médio das raízes secundárias (TMRS). O grupo controle (mantido em água destilada durante os sete dias) também passou pela transferência de recipientes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 10 plântulas para cada tratamento.

Exame dos elementos de xilema

Para esta avaliação as plântulas cresceram nas mesmas condições de temperatura e luz citadas no bioensaio de crescimento. Decorrido quatro dias, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, foi separado o segmento da raiz primária e imerso em álcool 70%.

Para a técnica de coloração foi utilizado o método Fuchs modificado (Kraus e Arduin, 1997), onde as raízes ficaram imersas em álcool (70%) durante uma semana e, depois, foram colocadas em solução de soda cáustica (NaOH) 25% durante período de 24 a 48 h até que o material estivesse clarificado. Após este processo, o material vegetal foi submetido ao seguinte procedimento: imersão em solução 2% de ácido acético glacial (CH_3COOH) durante 30 minutos; álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 30% durante 5 minutos; safranina ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{C}_1$) em meio hidro-alcoólico (50%) durante 30 minutos; solução de álcool etílico 30% + 0,5 mL de ácido acético durante 5 minutos e, por último, álcool etílico 30% durante 5 minutos. Após a coloração, foram montadas lâminas de vidro tendo as raízes em xarope de Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus–BX41) acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Nessas observações foram utilizadas quatro raízes primárias provenientes de plântulas de gergelim crescidas em água ou nos diferentes extratos de *Aristolochia esperanzae*. De cada raiz foi fotografado 50% do seu comprimento total, da região central em direção ao colo. A partir destas fotos foram medidas as células centrais do metaxilema. As células do metaxilema iniciam sua diferenciação tardiamente e, só completam a maturação ou total diferenciação depois do processo de alongamento ter sido concluído e, por isso, são menos afetadas pelo alongamento das células ao seu redor. De cada fotografia foram realizadas medidas

de no máximo 10 células sempre com o aumento de 20 vezes (Programa Image Pro Plus).

Tratamento dos dados e análise estatística

O delineamento experimental dos bioensaios foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os valores de porcentagem foram transformados em arco seno ($\sqrt{\%}$) (Labouriau, 1983). Para todos os grupos de valores obtidos (tratamentos) foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (Lillifors). Os dados foram submetidos à análise de variância (um critério) e, dependendo da distribuição, foi utilizado teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) ou paramétrico (Tukey) a 5% de probabilidade (Santana e Ranal, 2004). As análises estatísticas foram realizadas no Programa BioEstat 5.0.

Resultados e discussão

Bioensaio de germinação

Pode-se observar que os extratos de folhas e caules não causaram alterações na porcentagem de germinação das sementes de gergelim em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, o extrato de raízes 7,5% causou redução significativa na porcentagem de germinação de sementes de gergelim. Não houve germinação das sementes de gergelim na presença do extrato de raízes 10%. Em relação à velocidade de germinação das sementes pode-se observar que, com exceção do extrato de caule 5%, todos os demais extratos causaram atraso na germinação das sementes de gergelim (Figura 3).

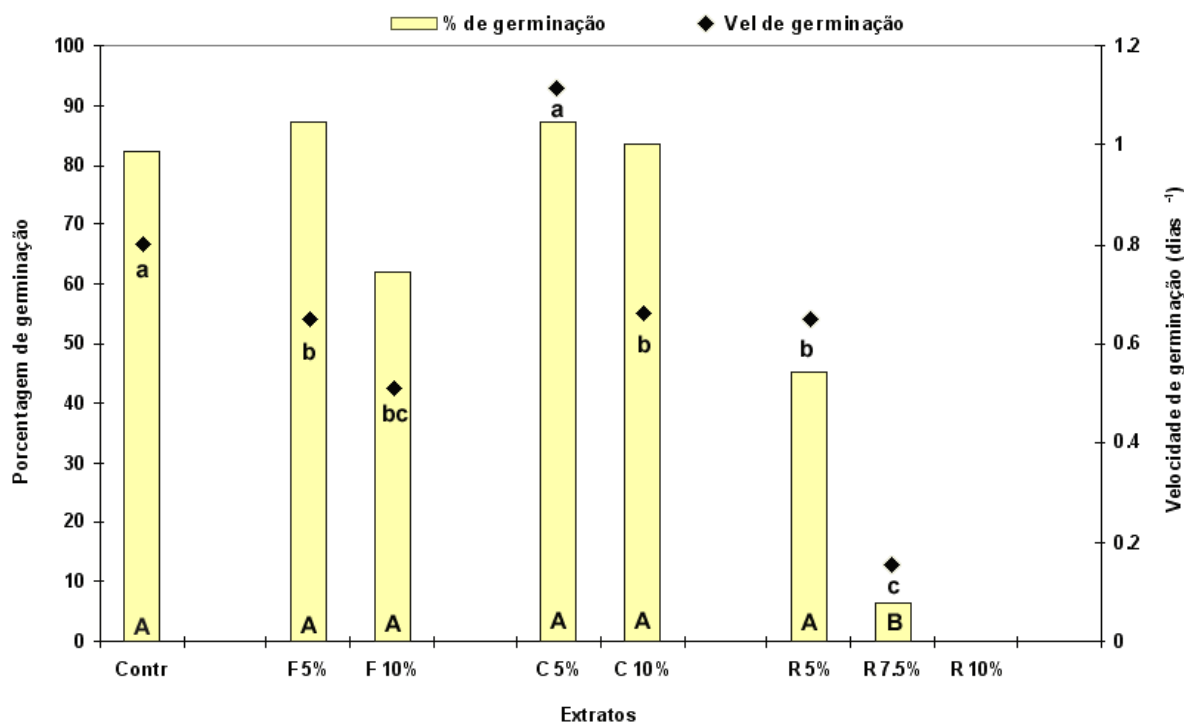


Figura 3 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de gergelim submetidas à ação de extratos aquosos de folha 5% (F 5%) e 10% (F 10%), caule 5% (C 5%) e 10% (C 10%) e raiz 5% (R 5%), 7,5% (R 7,5%) e 10% (R 10%) de *Aristolochia esparanzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis para os dados de porcentagem de germinação, e minúsculas pelo teste de Tukey para os dados de velocidade de germinação.

Alterações no padrão de germinação podem resultar de efeitos sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução de RNA, integridade dos mensageiros secundários, da respiração, conformação de enzimas e de receptores, ou uma ação conjunta destas alterações (Rizvi e Rizvi, 1992; Ferreira e Áquila, 2000). Por exemplo, o composto MBOA (6-Methoxy-2-benzoxalinone) inibe a germinação de alface por impedir a indução da síntese de α -amilase, que mobiliza as reservas armazenadas e mantém a atividade respiratória das sementes (Kato-Noguchi e Macías, 2005). Baleroni *et al.* (2000) demonstraram que na presença de ácidos p-cumárico e ferúlico foi mais alto o conteúdo total de lipídeos nos cotilédones de sementes de canola e, sugerem que esta alteração aconteça por redução na mobilização de reservas durante a germinação em presença destes compostos fenólicos.

Muitas vezes, o efeito alelopático não é observado na porcentagem final de germinação e sim, na velocidade de germinação das sementes, o que pode fornecer indicações importantes sobre o aleloquímico (Ferreira, 2004). Atrasos na germinação de sementes de qualquer espécie podem ter implicações biológicas importantes, pois se refletirão no estabelecimento de sua plântula em condições naturais (Escudero *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2001) e em suas chances de competição por recursos com espécies vizinhas (Weiner *et al.*, 1997).

Os extratos de *Aristolochia esperanzae* alteraram o processo germinativo das sementes de gergelim, sugerindo que estas alterações possam também ocorrer em ambiente natural. Dentre os extratos dos diferentes órgãos utilizados, os de raiz foram os que mais inibiram a germinação e, esta inibição foi dependente das concentrações utilizadas, com supressão total da germinação na concentração 10% (Figura 3).

Bioensaio de crescimento

O crescimento da parte aérea foi estimulado quando as plântulas de gergelim cresceram na presença dos extratos de folhas e caules (5 e 10%), porém, quando os extratos de raízes (5 e 7,5%) foram utilizados, os valores de parte aérea das plântulas não diferiram estatisticamente do controle. Todas as plântulas apresentaram-se deterioradas quando foram expostas ao extrato de raiz 10% (Figura 4).

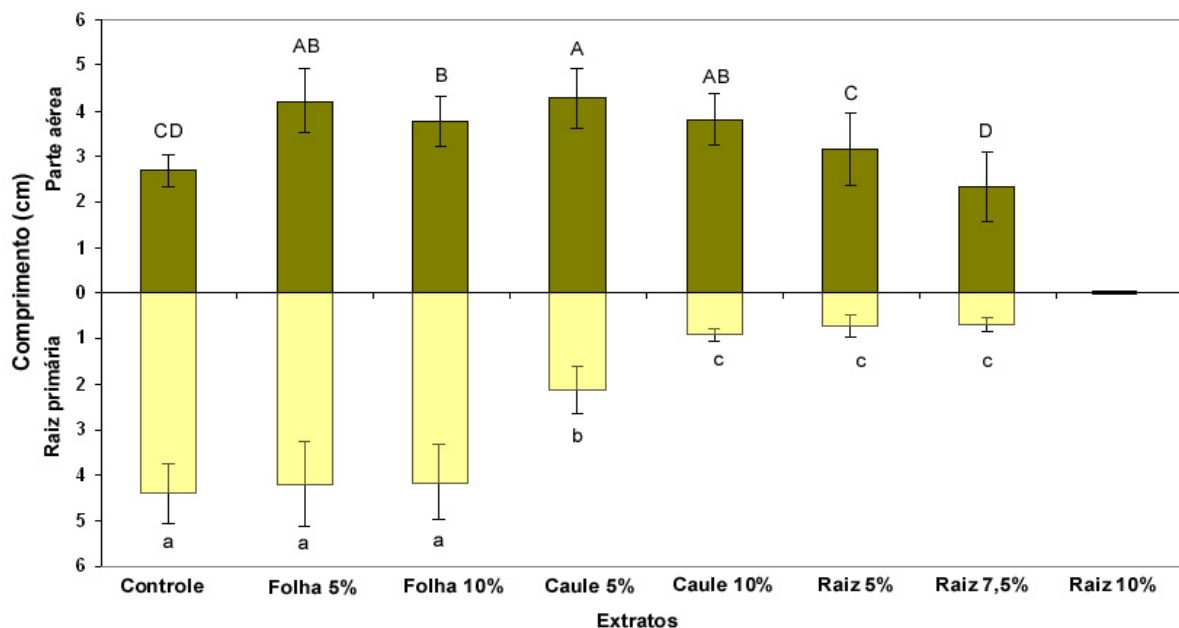


Figura 4 – Comprimentos médios (\pm desvio padrão) da parte aérea e raiz primária (cm) de gergelim crescidos sob influência de extratos aquosos de folha (5 e 10%), caule (5 e 10%) e raiz (5, 7,5 e 10%) de *Aristolochia esperanzae*, e o controle em água. (n = 16 plântulas). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (parte aérea) e minúsculas (raiz primária) não diferem entre si pelo teste Tukey.

Outros trabalhos identificaram também estímulo no crescimento das plantas alvo em presença de extratos, como por exemplo, com o uso de extratos de *Euphorbia serpens* houve estímulo da parte aérea e radicular de *Lactuca sativa* (Dana e Domingo, 2006), assim como, extratos de folha de *Phytolacca americana* estimularam o crescimento da parte aérea e raiz de plântulas de *Cassia mimosoides* (Kim *et al.*, 2005).

Em relação ao comprimento das raízes primárias verifica-se que o extrato de folha não produziu diferença significativa em relação ao grupo controle. No entanto, os extratos de caules e raízes causaram redução significativa no crescimento das raízes primárias de gergelim. As raízes primárias estavam escurecidas e necrosadas quando mantidas no extrato de raiz 7,5%. Assim, verifica-se que, em relação ao crescimento inicial, as raízes primárias das plântulas de gergelim apresentaram maior sensibilidade aos extratos de raiz de *Aristolochia esperanzae* do que a parte aérea (Figura 4).

Muitos outros trabalhos também evidenciaram que as raízes são mais sensíveis aos aleloquímicos quando comparadas com a parte aérea das plantas (Hamdi *et al.*, 2001; Dias e Moreira, 2002; Parvez *et al.*, 2003; Punjani *et al.*, 2006; Abdelgaleil e Hashinaga, 2007; Ercoli *et al.*, 2007). Extratos de alfafa (*Medicago*

sativa) e cumarina aumentaram o diâmetro das raízes de alfafa, que segundo os autores foi devido à expansão do cilindro vascular central e, às alterações nas camadas de células do córtex (Chon *et al.*, 2002).

Os monoterpenos cânfora, eucaliptol, limoneno e α -pineno inibiram o crescimento de raízes de milho e os autores demonstraram que esta inibição aconteceu por alterações no metabolismo mitocondrial, alterando assim, vários outros processos fisiológicos e metabólicos associados ao crescimento e do desenvolvimento das plantas (Abrahim *et al.*, 2000).

Plântulas de milho apresentaram redução do índice mitótico em presença do extrato de *Leucena leucocephala* e, foi observado que a ausência de divisão celular e o espessamento destas raízes foi devido ao aumento da atividade da enzima peroxidase nestas plântulas (Pires *et al.*, 2001). Outros trabalhos também identificaram alterações nos índices mitóticos em presença de substâncias alelopáticas (Dayan *et al.*, 1999; Jacobi e Fleck, 2000; Pires *et al.*, 2001; Iganci *et al.*, 2006) Concentrações de 0,1 e 0,15mM de sorgoleone provocaram alterações na formação da parede celular e deformação dos elementos de vaso, além de descontinuidade na bainha amilífera (Hallak *et al.*, 1999).

Assim sendo, semelhante ao obtido no bioensaio de germinação, os extratos de raiz de *A. esperanzae* foram os que proporcionaram maior efeito inibitório, provocando alterações morfológicas e diminuição no crescimento e desenvolvimento das raízes das plântulas de gergelim. Hao *et al.* (2007) não identificaram diferença no efeito inibitório de extratos de folhas, caule ou raiz de *Citrullus lanatus* no crescimento de *Lactuca sativa*, mas constatou que exudados de raiz de *Citrullus lanatus* inibiu o crescimento da própria espécie e também de plântulas de *Lactuca sativa*.

Exudados e resíduos de raízes são comumente conhecidos como as duas principais fontes de liberação de aleloquímicos no solo (Yu *et al.*, 2000) e, geralmente estes compostos ficam estocados nas células radiculares para serem posteriormente liberados (Rice, 1984). Este pode ser o modo como provavelmente os aleloquímicos de *A. esperanzae* sejam liberados no solo, confirmando a maior atividade inibitória (tanto na germinação quanto no crescimento) com o uso dos extratos de raízes.

Bioensaio de recuperação

Verificou-se que houve estímulo do crescimento da parte aérea das plântulas quando estas permaneceram sete dias nos extratos de folha e caule a 5% de *A. esperanzae* (com diferença significativa entre as plântulas que permaneceram 2 dias e 7 dias em presença dos extratos) (Figura 5), enquanto que os extratos de raiz causaram escurecimento em 100% das raízes de gergelim (Tabela 1). Em relação à presença e às características de raízes secundárias pode-se observar que para as plântulas que permaneceram sete dias nos extratos de *A. esperanzae* os valores de PPRS foram significativamente diminuídos com o uso dos extratos de caule e raiz nas concentrações utilizadas. Os valores de NRS/RP foram significativamente diferentes do controle com o uso dos extratos de folha a 10%, caule (5 e 10%) e raiz (5, 7,5 e 10%) quando as plântulas permaneceram sete dias sob influência dos extratos. Ainda, pode-se observar que o tamanho médio das raízes secundárias foi reduzido significativamente nas plântulas que cresceram durante sete dias na presença dos extratos de folha (5 e 10%) e caule (10%) (Tabela 1).

A resposta de recuperação das plântulas, que foram retiradas da influência dos extratos (após a permanência de dois dias) aconteceu quando os valores de comprimento de parte aérea e raiz foram comparados com aqueles obtidos das plântulas que ficaram sete dias nos respectivos extratos, e não, em relação aos grupos controles. Com a transferência das plântulas para a água após a permanência de dois dias nos extratos, registrou-se que com o uso do extrato de caule 5% as plântulas recuperaram o tamanho de suas raízes primárias, em relação àquelas que permaneceram sete dias no mesmo extrato. Quando os extratos de raiz 7,5 e 10% foram utilizados também houve recuperação do crescimento, tanto da parte aérea quanto da raiz primária, em relação às plântulas que ficaram sete dias nos mesmos extratos (Figura 5).

No entanto, para as plântulas que permaneceram dois dias nos extratos de folha (10%), caule (10%) e raiz (5%) e depois foram transferidas para substrato umedecido com água, não se observou diferenças significativas no crescimento da parte aérea e/ou da raiz primária, em relação àquelas que permaneceram durante sete dias sob influência dos extratos, ou seja, não havendo resposta de recuperação no crescimento das plântulas para os parâmetros avaliados (Figura 5).

As plântulas que foram transferidas para a água após dois dias de permanência nos extratos apresentaram resposta de recuperação, considerando a presença, quantidade e tamanho das raízes secundárias em relação àquelas plântulas que permaneceram sete dias nos extratos e, em alguns casos, também em comparação aos grupos controles (Tabela 1).

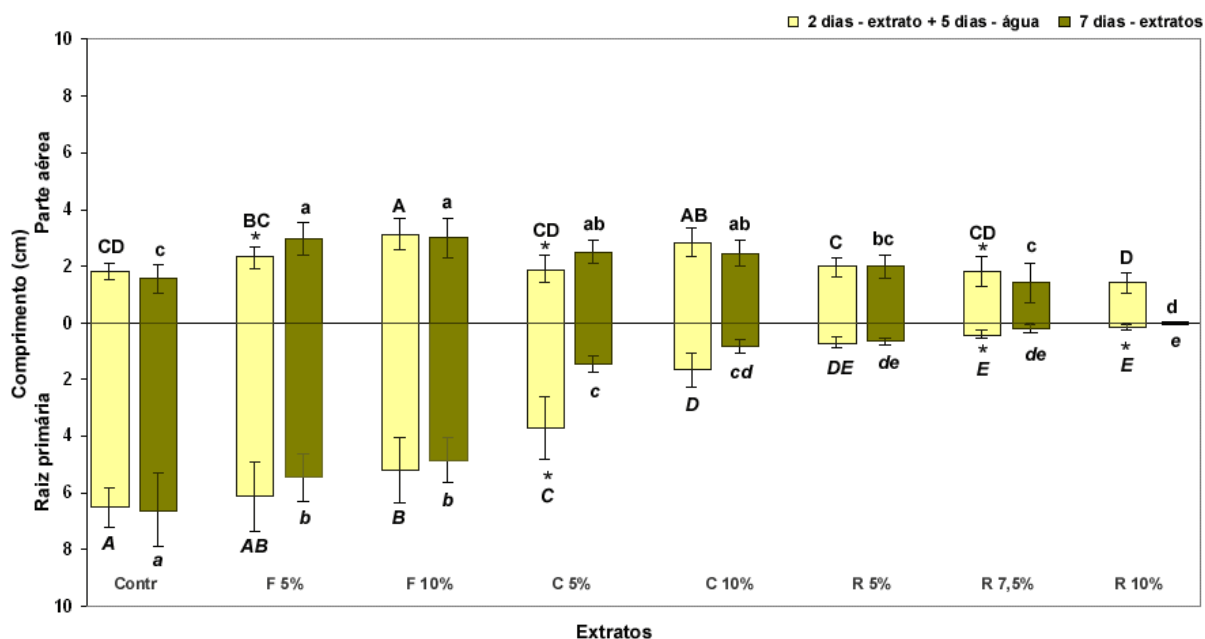


Figura 5 - Comprimentos médios (\pm desvio padrão) da parte aérea e raiz primária de plântulas de gergelim crescidas em duas condições: dois dias nos extratos + cinco dias em água (barras amarelas) e 7 dias nos extratos (barras verdes) de folha 5% (F 5) e 10% (F 10%), caule 5 (C 5%) e 10% (C 10%) e raiz 5 (R 5%), 7,5% (R 7,5%) e 10% (R 10%) de *Aristolochia esperanzae*, e o controle em água (Contr). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (barras amarelas) e minúsculas (barras verdes) não diferem entre si pelo teste Tukey. (n = 16 plântulas). * indica diferença entre as médias quando comparadas às condições de crescimento (dois dias nos extratos + cinco dias em água - barras amarelas com 7 dias nos extratos - barras verdes) para o mesmo extrato (Teste de Tukey).

Não houve desenvolvimento de raízes secundárias nas plântulas que cresceram sete dias nos extratos de raiz em todas as concentrações (5; 7,5 e 10%), porém quando foram transferidas para água depois de permanecerem dois dias nestes mesmos extratos, houve desenvolvimento de raízes secundárias em 25, 87,5 e 81,25%, respectivamente, das plântulas analisadas. Este fato aconteceu mesmo quando as raízes primárias estavam com tamanho reduzido e escurecidas (Tabela 1; Figura 6). Aumento nos valores de NRS/RP e TMRS foram observados em plântulas que permaneceram dois dias nos extratos de folha 10% e extratos de raiz (5; 7,5 e

10%) e depois foram transferidas para o substrato umedecido com água em relação às que permaneceram sete dias nos extratos (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito dos extratos de folhas, caules e raízes (5, 7,5 e 10%) de *Aristolochia esperanzae* na porcentagem de plântulas com raízes primárias escurecidas; porcentagem de plântulas com raízes secundárias (PPRS), número médio de raízes secundárias em cada raiz primária (NRS/RP) e tamanho médio das raízes secundárias (TMRS) de gergelim quando crescidas em duas condições: dois dias nos extratos + mais cinco dias em água, e sete dias nos extratos, além do controle. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (dois dias nos extratos + cinco dias em água) e minúsculas (7 dias nos extratos) não diferem entre si pelo teste Tukey. * indica diferença entre as médias quando comparados às condições de crescimento para o mesmo extrato (Teste de Tukey).

Condições de crescimento	Extratos	% de plântulas com raízes primárias escurecidas	% de plântulas com raízes secundárias (PPRS)		nº médio de raízes secundárias / raízes primárias (NRS/RP)		Tamanho médio das raízes secundárias (cm) (TMRS)	
2 dias extrato + 5 dias água	Controle	0	93,75 (±12)	A	4,56 (±1,5)	A	0,95 (±0,4)	A
	Folha 5%	0	87,5 (±14)	A	5,81 (±1,9)	A	0,70 (±0,4)	AB
	Folha 10%	0	87,5 (±14)	A	5,37 (±1,5)	A *	0,46 (±0,2)	AB *
	Caule 5%	0	25 (±0)	B	1,5 (±0,7)	B	0,25 (±0,1)	C
	Caule 10%	0	25 (±0)	B	0,75 (±0)	B	0,22 (±0,07)	BC
	Raiz 5%	43,7	25 (±0)	B *	0,25 (±0)	B *	0,79 (±0,07)	AB *
	Raiz 7,5%	100	87,5 (±14)	A *	1,25 (±0,5)	B *	0,81 (±0,6)	AB *
	Raiz 10%	100	81,25 (±23)	A *	1,875 (±0,4)	B *	0,62 (±0,4)	AB *
7 dias extrato	Controle	0	87,5 (±14)	a	6,0 (±1,1)	a	0,93 (±0,4)	a
	Folha 5%	0	81,25 (±23)	a	4,25 ± 2,9	ab	0,38 (±0,2)	ab
	Folha 10%	0	68,25 (±23)	ab	2,81 ± 1,2	bc	0,26 (±0,1)	b
	Caule 5%	0	37,50 (17)	bc	1,66 ± (0,4)	cd	0,30 (±0,1)	ab
	Caule 10%	0	6,25 (±0)	c	0,25 (±0)	d	0,14 (±0)	b
	Raiz 5%	100	0	-	-	-	-	-
	Raiz 7,5%	100	0	-	-	-	-	-
	Raiz 10%	100	0	-	-	-	-	-

Para alguns autores, o conceito de reversão baseia-se em amenizar parcial ou totalmente os efeitos inibitórios fitotóxicos, fornecendo um substrato que elimine a deficiência fisiológica ocasionada pelo aleloquímico ou ainda que reaja diretamente com ele, impedindo sua ação. A reversão dos efeitos deletérios é alcançada quando o inibidor/aleloquímico é aplicado na menor concentração capaz de induzir a inibição (Dayan, 2000). Na menor concentração do extrato de raiz 5% houve diminuição da porcentagem de plântulas com raízes escurecidas quando estas foram retiradas do extrato e colocadas em água. Porém, este fato não foi observado com o uso de extratos em maiores concentrações (7,5 e 10%) (Tabela 1).

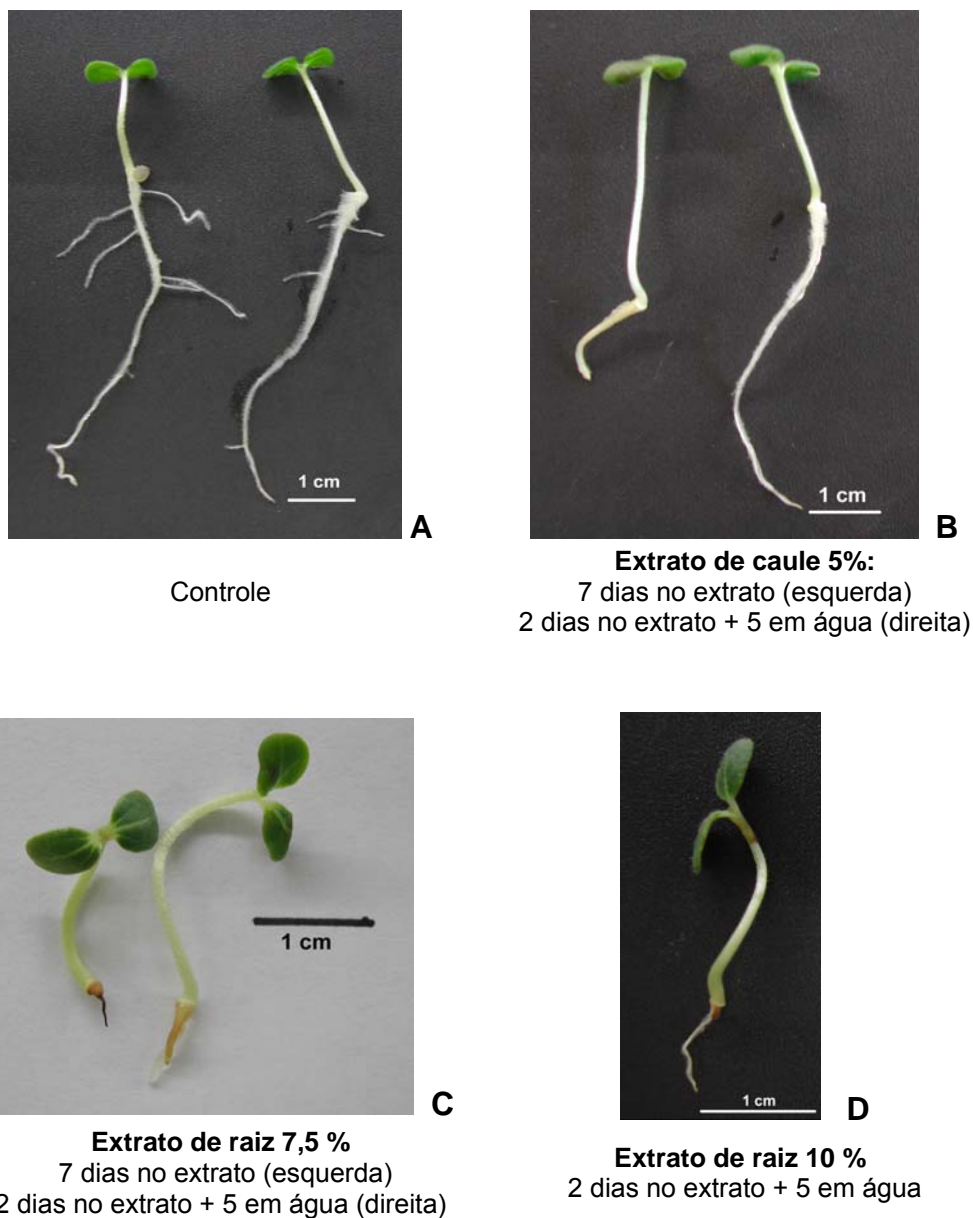


Figura 6 – Plântulas de gergelim que permaneceram sob influência dos extratos durante dois dias e depois foram transferidas para água (2/5 dias) ou que permaneceram durante sete dias nos extratos (7 dias). A – Controle (água); B - extrato de caule 5% (esquerda: sete dias no extrato / direita: dois dias no extrato + cinco em água (2/5 dias)); C – extrato de raiz 7,5% (esquerda: sete dias no extrato / direita: dois dias no extrato + cinco em água (2/5 dias)); D – extrato de raiz 10% (dois dias no extrato + cinco em água / apodrecida quando permaneceu sete dias no extrato).

Compostos fenólicos podem causar escurecimento em raízes por seqüestrarem oxigênio e, esta condição pode ser revertida quando as plântulas são retiradas da presença destes compostos, no entanto, este escurecimento das raízes não deve ser confundido com tecidos necrosados, pois, tecidos nesta condição não conseguem reverter seu crescimento (Jerônimo, 2006), já que o processo de

necrose é caracterizado por morte celular (Taiz e Zeiger, 2004). Em outros estudos visando observar a reversão de inibição de crescimento, foi registrado que plântulas de canola retomaram seu crescimento, após serem retirados da influência do aleloquímico 1,8-cineol (Koitabashi *et al.*, 1997). Plântulas de gergelim também recuperaram suas características morfológicas, quando retiradas da influência de extratos de lobeira (*Solanum lycocarpum*), adquirindo características semelhantes às plântulas que cresceram em água (controle) (Jerônimo, 2006).

Elementos no xilema

O tamanho médio das células do metaxilema das plântulas crescidas em água foi de 150,89 μm ($\pm 54,11$). As plântulas que cresceram na presença dos extratos de folha, caule e raiz de *Aristolochia esperanzae*, apresentaram valores médios das células, estatisticamente menores que os do grupo controle (em torno de 50%) (Figuras 7 e 8). Estes dados foram também observados em preparados contendo as células do metaxilema das plântulas crescidas em água ou sob influência dos extratos de raízes de *A. esperanzae* (Figura 8).

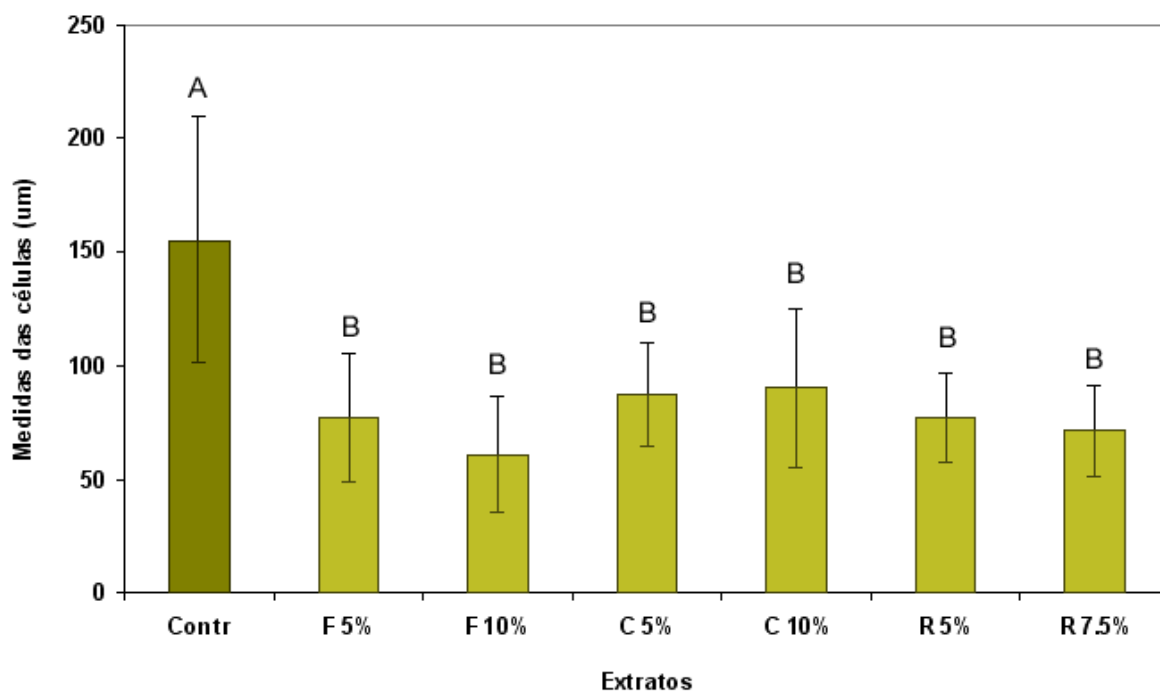


Figura 7 - Tamanho das células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim crescidas nos extratos de folha 5% (F 5) e 10% (F 10%), caule 5 (C 5%) e 10% (C 10%) e raiz 5 (R 5%), 7,5% (R 7,5%) e 10% (R 10%) de *Aristolochia esperanzae*, e o controle em água (Contr).

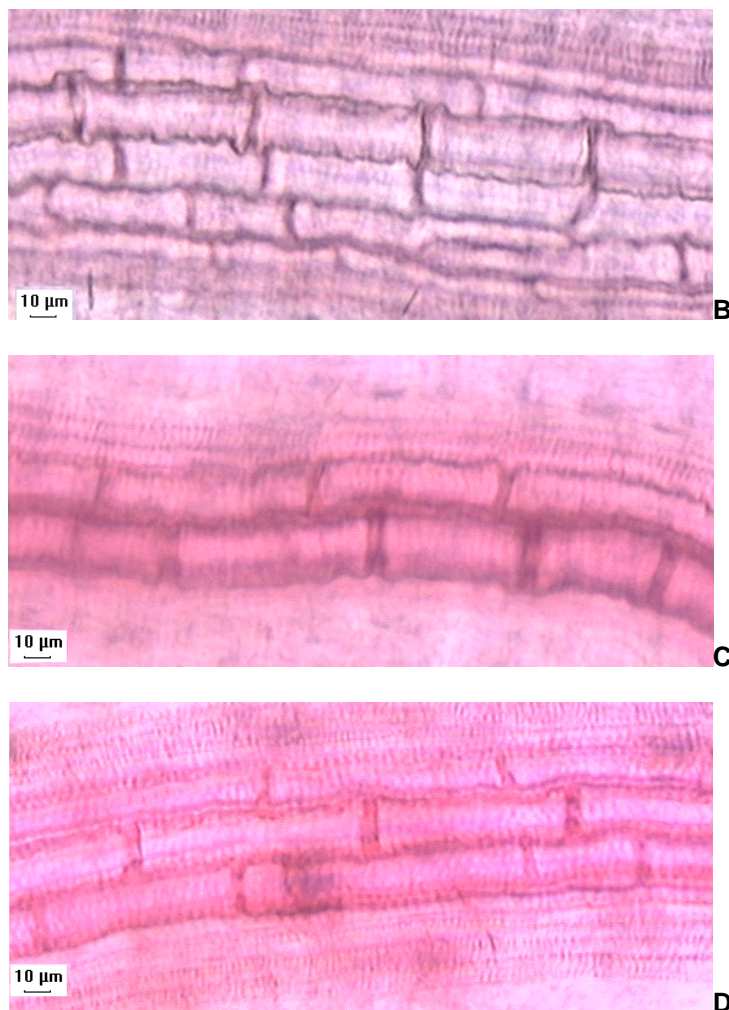


Figura 8 - Fotomicrografia de células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim crescidas em água (A), e em presença dos extratos folha 10% (B), caule 10% (C), raiz 7,5% (D) de *Aristolochia esperanzae*.

A partir dos dados de porcentagem de células distribuídas em classes de tamanhos observou-se que no grupo controle houve uma distribuição homogênea de tamanho celular, com o maior valor encontrado (37,70%) para as células pertencentes a tamanhos entre 101-150 μm . Ainda em relação ao grupo controle, observa-se que não foram encontradas células menores que 50 μm , porém registrou-se a presença de células com tamanhos superiores a 151 μm . Diferentemente do grupo controle, as plântulas que cresceram sob influência dos extratos de *A. esperanzae* apresentaram células distribuídas de forma mais homogênea nas diferentes classes de tamanhos de celulares. Nas células provenientes de plântulas crescidas na presença dos extratos de folha e caule há predominância na classe de tamanho entre 51-100 μm .

Nos extratos de raízes (5 e 7,5%) estes valores são comuns na porcentagem de células da classe de 51-100 μm com valores de 78,8 e 79,5%, respectivamente. Nota-se que as células do metaxilema das raízes que cresceram sob influência dos extratos de raiz não apresentam tamanho superior a 151 μm (Figura 9).

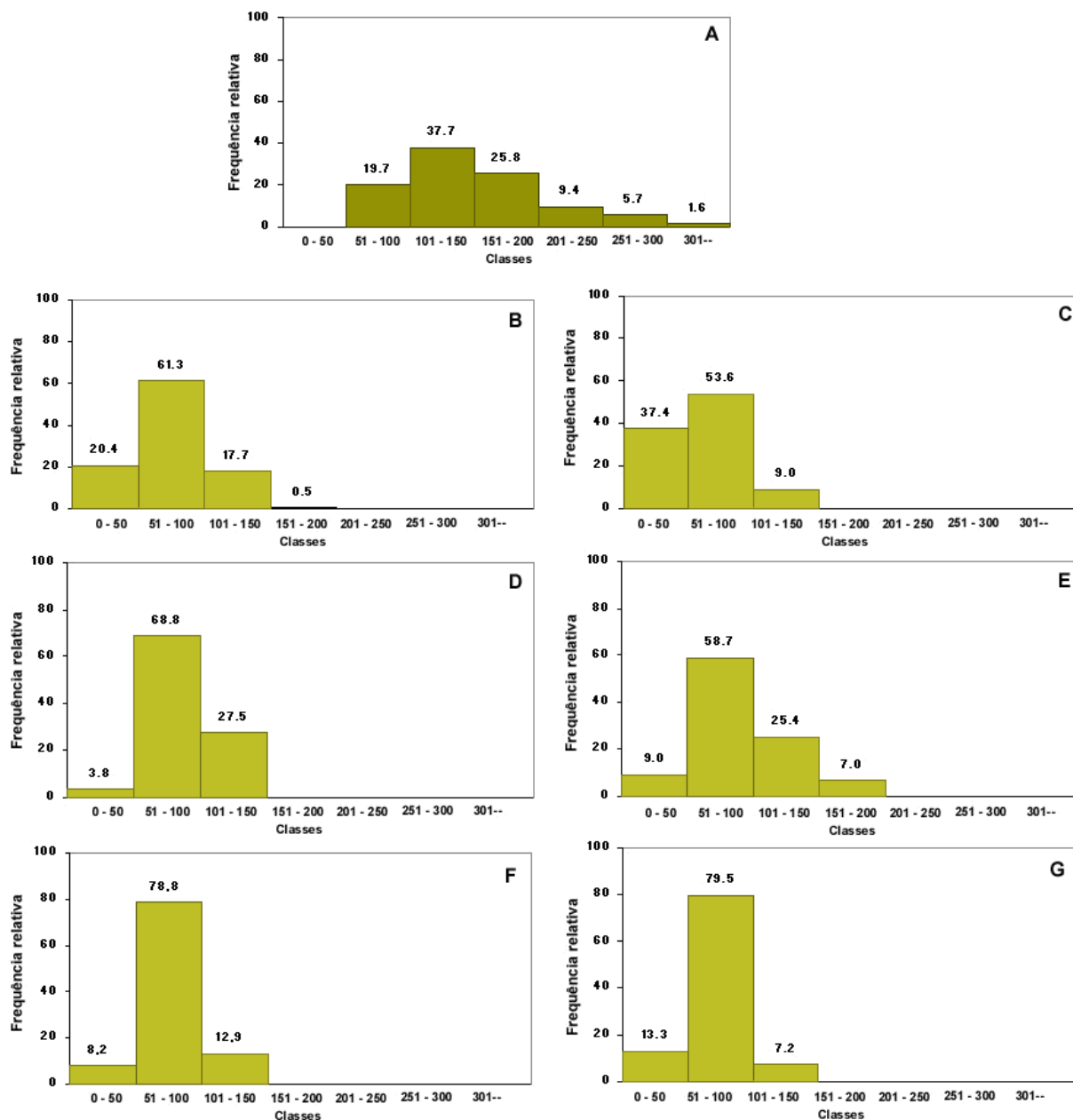


Figura 9 - Distribuição de elementos xilêmicos radiculares de plântulas de gergelim em classes de tamanho (μm) quando crescidos em água (A – controle) e em diferentes extratos de folhas 5% (B) e 10% (C), caules 5% (D) e 10% (E) e raízes 5% (F) e 7,5% (G) de *Aristolochia esperanzae*.

Os extratos de *Aristolochia esperanzae* inibiram o crescimento das raízes de gergelim e esta inibição aconteceu pela diminuição no alongamento das células

radiculares do metaxilema das raízes. Isto indica a provável interferência dos aleloquímicos presentes nos extratos de *Aristolochia esperanzae* sobre as concentrações das diferentes categorias de hormônios. Sabe-se que as auxinas têm uma importante função no crescimento e desenvolvimento das plantas (Muday, 2002), modulando diversos processos, como as respostas trópicas a luz e gravidade, arquitetura geral de raízes e caules, desenvolvimento vascular, alongação celular, entre outros (Cleland, 2004). Além disso, o nível de auxina livre parece regular o número dos elementos de vasos, bem como suas dimensões (Taiz e Zeiger, 2004). Segundo Einhellig (1986) o mecanismo de ação de várias substâncias fenólicas caracteriza-se por sua interação com o ácido indolacético (AIA), podendo agir como repressores da destruição do AIA ou estimulando a AIA-oxidase.

O transporte polar das auxinas é determinante para o desenvolvimento das plantas (Kramer e Bennett, 2006). Tanto as proteínas PIN como certos transportadores ABC tem função no transporte polar das auxinas (Blakeslee *et al.*, 2005; Geisler e Murphy, 2006). Estes transportadores facilitam também o transporte de AIA (dos ápices dos primórdios foliares até os ápices das raízes primárias), para que este esteja disponível para o desenvolvimento dos primórdios de raízes laterais, já que estas estão reguladas por esse fitohormônio (Casimiro *et al.*, 2001; 2003). Vários mutantes deficientes em auxinas também apresentaram deficiências em outros hormônios, sugerindo comunicação ou *cross-talk* entre as vias de respostas dos fitormônios (Woodward e Bartel, 2005). Existem outros hormônios que modulam os níveis e as respostas às auxinas (Morris *et al.*, 2004).

As auxinas parecem controlar o crescimento da raiz modulando a resposta celular para as giberelinas e, assim as giberelinas se opõem à ação das proteínas *DELLA* que são repressoras do crescimento, portanto as auxinas são necessárias para a resposta de crescimento mediado por giberelinas (Fu e Harberd, 2003; Hardtke, 2003; Dolan e Davies, 2004).

As citocininas e as auxinas são importantes na regulação e no desenvolvimento radicular, na diferenciação vascular e no gravitropismo das plantas e, alguns trabalhos sugerem ainda que estes dois hormônios, em conjunto com o etileno regulam também a iniciação das raízes laterais (Aloni *et al.*, 2006; Kyojuka, 2007). As citocininas têm seus sítios principais de síntese no ápice radicular (Peres e Kerbauy, 2004) e, qualquer desarranjo provocado pelos aleloquímicos deve ter influência sobre a produção e transporte deste fitormônio. Ademais é conhecido o

efeito sinérgico entre citocininas e etileno, alterando o comportamento de desenvolvimento e como o balanço entre citocininas e auxinas é o principal regente da harmonia entre a parte aérea e raízes, qualquer alteração de distribuição ou produção afeta o crescimento (Peres e Kerbauy, 2004). Além disso, o efeito do etileno no crescimento de raízes é fortemente mediado pela regulação da biossíntese da auxina, e este estimula a biossíntese de auxina e seu transporte basípeto para a zona de alongação, resultando na inibição do alongamento celular (Ruzicka *et al.*, 2007).

Aliotta *et al.* (2004) demonstraram que a expansão de células radiculares foi reduzida em presença de diferentes concentrações de resíduos de *Olea europea* e esta redução resultou no engrossamento da ponta da raiz em comparação ao controle. Segundo Al-Wakeel *et al.* (2007) a inibição da alongação celular pode estar relacionada com a ação direta dos aleloquímicos por interferirem também no processo de divisão celular alterando o equilíbrio entre os diferentes hormônios.

As plântulas de gergelim que cresceram sob influência dos extratos, em geral apresentaram inibição no crescimento das raízes primárias e diminuição em 50% do tamanho das células do xilema radicular.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que os diferentes extratos de *A. esperanzae* causaram alterações na germinação e o crescimento das plântulas de gergelim. Dentre os extratos dos diferentes órgãos utilizados, os de raiz foram os que mais inibiram a germinação e o crescimento de gergelim e, esta inibição foi dependente da concentração utilizada, provocando alterações morfológicas e diminuição no crescimento e desenvolvimento das plântulas, com supressão total da germinação e do crescimento na concentração 10%. A exudação radicular pode ser o modo como os aleloquímicos de *A. esperanzae* sejam liberados no solo, confirmando a maior atividade inibitória com o uso dos extratos de raízes.

As plântulas de gergelim não recuperam seu crescimento em relação aos valores de parte aérea e raiz, quando colocadas em água e quando estes valores foram comparados aos obtidos para os comprimentos dos grupos controles. Além disso, com o uso dos extratos houve alteração no número e tamanho das raízes laterais. A inibição causada pelos extratos de *A. esperanzae* pôde ser observada em nível celular, demonstrando diminuição em 50% do tamanho das células do xilema radicular, comprovando a inibição da alongação das células radiculares. Sendo

assim, não é possível determinar qual é a principal ou qual a ação direta dos aleloquímicos presentes nos extratos de *Aristolochia esperanzae*, mas é provável que estejam relacionados ao metabolismo de biossíntese, concentração e/ou sensibilidade dos diversos fitohormônios.

Conclusões

Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando os extratos de folhas, caule e raízes de *Aristolochia esperanzae* sob a germinação e crescimento de gergelim, pode-se observar que:

- Os extratos de raiz de *A. esperanzae* foram os que proporcionaram maior efeito inibitório, provocando alterações morfológicas e diminuição no crescimento e desenvolvimento das plântulas de gergelim.

- Dentre os extratos dos diferentes órgãos utilizados, os de raiz foram os que mais inibiram a germinação.

- A inibição obtida nas sementes de gergelim com o uso dos extratos foi dependente da concentração utilizada.

- Os extratos inibiram o crescimento das raízes de gergelim e esta inibição aconteceu pela diminuição na elongação das células radiculares do metaxilema das raízes da espécie-alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas e auxílio concedidos (471135/2006-2), ao Prof^o Dr. Marcos Arduim pela ajuda e disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Anatomia, e a técnica Maristela Imatomi pela ajuda em fases deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- ABDELGALEIL, S.A.M.; HASHINAGA, F. (2007). Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 35(11): 737-742.
- ABRAHIM, D., BRAGUINI, W. L., KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology* 26(3): 611-624.
- ALIOTTA, G.; LIGRONE, R.; CINIGLIA, C.; POLLIO, A.; STANZIONE, M.; PINTO, G. (2004). Application of microscopic techniques to the study of seeds and microalgae under olive oil wastewater stress. p. 289-314. In: F.A. MACÍAS; J.C.G. GALINDO; J.M.G. MOLINILLO, H.G. CUTLER. *Allelopathy – Chemistry and mode of action of allelochemicals*. Washington, D.C. U.S.A., CRC Press.
- ALONI, R. ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* 97: 883-893.
- AL-WAKEEL, S.A.M.; GABR, M.A.; HAMID, A.A.; ABU-EL-SOUD, W.M. (2007). Allelopathic effects of *Acacia nilotica* leaf residue on *Pisum sativum* L. *Allelopathy Journal* 19(2): 411-422.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (2003). *Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil*. Ed. Alexandre Sene Pinto, Ribeirão Preto. 80p.
- BAGCHI, G.D.; JAIN, D.C.; KUMAR, S. (1997). Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 45(6): 1131-1133.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E; FERRARESE-FILHO, O. (2000). Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biologia Plantarum* 43(2): 313-316.
- BARKOSKY, R.R.; EINHELLIG, F.A.; BUTLER, J.L. (2000). Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurge *Euphorbia esula*. *Journal of Chemical Ecology* 26(9): 2095-2109.
- BIOESTAT 5.0 – *Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. (2007). Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Pará, Brasil, (www.mamiraua.org.br).
- BLAKESLEE, J.J.; PEER, W.A.; MURPHY, A.S. (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* , 8: 494-500.
- BORGHETTI, F., FERREIRA, A. G. (2004). Interpretação de resultados de germinação. p. 209-222. In: G.A. FERREIRA, F. BORGHETTI (eds.). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Editora Artmed.

- CAPELLARI, L.J. (1991). *Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo*. Campinas, Universidade de Campinas, 1991. (Dissertação de Mestrado).
- CASIMIRO, I; BEECKMAN, T.; GRAHAM, N; BHALERAO, R; ZHANG, H.; CASERO, P.; SANLBERG, G.; BENNETT, M.J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8(4): 165-171.
- CASIMIRO, I; MARCHANT, A.; BHALERAO, R; BEECKMAN, T.; DHOOGHE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N; INZÉ, D.; SANLBERG, CASERO, P.; BENNETT, M.J. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell*, 13: 843-852.
- CHAVES, N., SOSA, T.; ESCUDERO, J.C. (2001). Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 623-631.
- CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S.; JANG, H.G.; PYO, B.S.; KIM, H.G. (2002). Effects of alfafa leaf extracts and phenolics allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. *Crop Protection*, 21: 1077-1082.
- CHOU, C.H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(5): 609-636.
- CLELAND, R.E. (2004). The final action of hormones. p. 204-220. In: P.J. DAVIES. *Plant hormones – Biosynthesis, signal transduction, action!*. Boston, London, Kluwer Academic Publishers. 750p.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. (1998). Effects of allelochemical stress produced by on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(12): 2039-2057.
- DANA, E. D.; DOMINGO, F. (2006). Inhibitory effects of aqueous extracts of *Acacia retinodes* Schltld, *Euphorbia serpens* L. and *Nicotiana glauca* Graham on weeds and crops. *Allelopathy Journal*, 18 (2): 323-330.
- DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9): 2079-2094.
- DAYAN, F.E.; WATSON, S.B.; GALINDO, J.C.G.; HERNÁNDEZ, A.; DOU, J.; McCHESNEY, J.D.; DUKE, O. (1999). Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65: 15-24.
- DIAS, L.S.; MOREIRA, I. (2002). Interaction between water soluble and volatile compounds of *Cistus ladanifer* L. *Chemoecology*, 12: 77-82.
- DOLAN, L.; DAVIES, J. (2004). Cell expansion in root. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 33-39.
- EINHELLIG, F.A. (1986). Mechanisms and modes of action of allelochemicals. p. 171-188. In: A.R. PUTNAM; C.S. TANG. *The science of allelopathy*. New York, John Wiley & Sons. 317p.

- EINHELLIG, F.A. (1996). Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal*, 88: 886-893.
- ERCOLI, L., MASONI, A., PAMPANA, S.; ARDUINI, I. (2007). Allelopathic effects of rye, brown mustard and hairy vetch on redroot pigweed, common lambsquarter and knotweed. *Allelopathy Journal*, 19(1): 249-256.
- ESCUADERO, A., ALBERT, M.J., PITA, J.M.; PÉREZ-GARCIA, F. (2000). Inhibitory effects of *Artemisia herba-alba* on the germination of the gypsophyta *Helianthemum squamatum*. *Plant Ecology*, 148: 71-80.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 175-204. Edição Especial.
- FERREIRA, A.G. (2004). Interferência: competição e alelopatia. p. 251-262. In: G.A. FERREIRA, F. BORGHETTI (eds.). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Editora Artmed. 323p.
- FERRI, M. G. 1969. *Plantas do Brasil e do cerrado*. São Paulo: Edgard Blücher, 239p.
- FRIEDMAN, J. (1995). Allelopathy, autotoxicity, and germination. p 629-644. In: J. KIGEL; G. GALILI. (eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker. 852 p.
- FU, X.; HARBERD, N.P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421: 740-743.
- GATTI, A.B., PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. (2004). Atividade Alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasílica*, 18(3): 459-472.
- GEISLER, M.; MURPHY, A.S. (2006). The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *Federation of European Biochemical Societies*, 580: 1094-1102.
- HALLAK, A.M.G.; DAVIDE, L.C.; GAVILANES, M.L; SOUZA, I.F. (1999). Efeito de exsudatos de raiz de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre características anatômicas do caule do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 23(2): 317-322.
- HAMDI, B.A., INDERJIT, OLOFSDOTTER, M.; STREIBIG, J.C. (2001). Laboratory bioassay for phytotoxicity: an example from wheat straw. *Agronomy Journal*, 93: 43-48.
- HAO, Z. P., WANG, Q., CHRISTIE, P.; LI, X.L. (2007). Allelopathic potencial of watermelon tissues and root exudates. *Scientia Horticulturae*, 112(3): 315-320.
- HARDTKE, C.S. (2003). Gibberellin signaling: GRASs growing dispatch roots. *Current Biology*, 13: 366-367.

- IGANCI, J.R.V.; BOBROWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; STEIN, V.C.; ROCHA, B.H.G. (2006). Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arquivos do Instituto Biológico*, 73(1): 79-82.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. (1995). On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*, 61(1): 28-44.
- INDERJIT; DUKE, S.O. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217: 529-539.
- JACOBI, U.S.; FLECK, N.G. (2000). Avaliação do potencial alelopático de genótipos de aveia no início do ciclo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(1): 11-19.
- KATO-NOGUCHI, H.; MACÍAS, F. A. 2005. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1304-1307.
- JERÔNIMO, C.A. (2006). *Efeitos do extrato aquoso de folhas de Solanum lycocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L. Brasília, Universidade de Brasília (Dissertação de Mestrado).
- KAUR, H.; INDERJIT; KAUSHIK, S. (2005). Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(1): 77-81.
- KIL, J.H.; SHIM, K.C. (2006). Allelopathic effects of *Tagetes minuta* L. and *Eupatorium rugosum* Houtt. Aqueous extracts on seedling growth of some plants. *Allelopathy Journal*, 18(2): 315-322.
- KIM, Y.O.; JOHNSON, J.D.; LEE, E.J. (2005). Phytotoxicity of *Phytolacca americana* leaf extracts on the growth, and physiological response of *Cassia mimosoides*. *Journal of Chemical Ecology*, 31(12): 2963-2974.
- KOITABASHI, R., SUZUKI, T., KAWAZU, T., SAKAI, A., KUROIWA, H.; KUROIWA, T. (1997). 1,8-Cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*, 110:1-6.
- KRAMER, E.M.; BENNETT, M.J. (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends in Plant Science*, 11(8): 382-386.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro, Seropédica, R. J. Editora Universitária Rural - EDUR, 198 p.
- KYOZUKA, J. (2007). Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:1-5.
- LABOURIAU, L.G. (1983). *A germinação de sementes*. Washington, D.C., Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. 175p.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S. (1988). Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. *Phytochemistry*, 27(7): 2265-2268.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V. (1988). Lignans from Brazilian *Aristolochiaceae*. *Revista Latinoamericana de Química*, 19(3-4): 113-117.

- MILLER, D.A. (1983). Allelopathic effects of alfafa. *Journal of Chemical Ecology*, 9(8): 1059-1072.
- MORRIS, D.A.; FRIML, J.; ZAZIMALOVA. (2004). The functioning of hormones in plant growth and development. p. 437-470. In: P.J. DAVIES. *Plant hormones – Biosynthesis, signal transduction, action!* Boston, London, Kluwer Academic Publishers. 750p.
- MUDAY, G.K. (2002). An emerging model of auxin transport regulation. *The Plant Cell*, 14:293-299.
- OLIVEIRA, S.C.C; CAMPOS, M.L. (2006). Allelopathic effects of *Solanum palinacanthum* leaves on germination and seedling growth of *Sesamum indicum* L. *Allelopathy Journal*, 18(2): 331-338.
- PARVEZ, S.S., PARVEZ, M.M., FUJII, Y.; GEMMA, H. (2003). Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. *Plant Growth Regulation*, 41: 139-148.
- PARVEZ, S.S., PARVEZ, M.M., FUJII, Y.; GEMMA, H. (2004). Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. *Plant Growth Regulation*, 42: 245-252.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. (2004). Citocininas. p 250-278. In: G.B. Kerbauy (ed.). *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 452p.
- PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. (2001). Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(1): 55-65.
- PRIESTAP, H.A.; RUVEDA, E.A.; MASCARET, O.A.; DEULOFEU, V. (1971). Aristolochic acids from *Aristolochia argentina* gris and *Aristolochia esperanzae* O. kuntze. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 59(3-4): 245.
- PUNJANI, B.L., PATEL, K.M.; PATEL, U.A. (2006). Allelopathic influence of *Prosopis cineraria* leaf extracts on germination and seedling growth of rice. *Allelopathy Journal*, 18(2): 339-344.
- PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. (1986). Allelopathy: state of the science. p. 1-19. In: A.R. PUTNAM; C.S. TANG. *The science of allelopathy*. New York, John Wiley & Sons. 317p.
- RAHMAN, A. (2006). Allelopathic potential of *Parthenium hysterophorus* L. on *Cassia* sp. *Allelopathy Journal* 18(2): 345-354.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(5): 577-608.
- RICE, E. L. (1984). *Allelopathy*. New York, Academic Press. 353 p.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (1992). *Allelopathy: basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall. 480 p.

- ROMAGNI, J.G.; ALLEN, S.N.; DAYAN, F.E. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 303-313.
- RUZICKA, K.; LJUNG, K.; VANNESTE, S.; PODHORSKÁ, R.; BEECKMAN, T.; FRIMI, J.; BENKOVÁ, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19: 2197-2212.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M. A. (2004). *Análise da germinação: um enfoque estatístico*. Brasília, Editora Universidade de Brasília. 247 p.
- SEIGLER, D. S. (1996). Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- WEINER, J. WRIGHT, D.B.; CASTRO, S. (1997). Symmetry of below-ground competition between *Kochia scoparia* individuals. *Oikos*, 79: 8591.
- WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. (1998). Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, 47(1): 1-2.
- YU, J.Q.; SHOU, S.Y.; QIAN, Y.R.; ZHU, Z.J.; HU, W.H. (2000). Autotoxic potential of cucurbit crops. *Plant and Soil*, 223: 147-151.

“COMPOSTOS BIOATIVOS DE RAÍZES DE *ARISTOLOCHIA ESPERANZAE* O. KUNTZE”

Resumo: (Compostos bioativos de raízes de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze). O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de metabólitos presente nas raízes de *Aristolochia esperanzae* que podem estar envolvidos em sua atividade alelopática. Dois tipos de extração foram realizadas para fracionar os extratos presente nas raízes desta espécie. As primeiras frações obtidas foram submetidas à bioensaios de alongamento de coleótilos de trigo e germinação de quatro tipos de sementes (agrião, tomate, alface e cebola). Após o resultado dos bioensaios, a fração diclorometano (extração líquido-líquido) foi a que mais inibiu os processos avaliados. Por sua similaridade em termos de polaridade com a fração diclorometano proveniente da extração direta com solvente, esta última foi submetida a uma seqüência de fracionamentos em coluna, HPLC e RMN. Foram encontrados como compostos majoritários das raízes de *Aristolochia esperanzae* três lignanas (sendo uma delas a fargesina) e estas substâncias podem ser as responsáveis pela atividade alelopática desta planta encontrada nos bioensaios.

Palavras-chave: inibição de germinação; exudação radicular, lignana, fargesina

Abstract: (Bioactive compounds from *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze roots). The purpose of this work was the isolation and characterization of metabolites present in *Aristolochia esperanzae* roots that can be involved in the activity allelopathic. Two types of extraction have been made to fractionate the extracts presented in the roots of this species. The first fractions obtained were submitted to the wheat coleoptiles elongation bioassays and germination test to four types of seeds (watercress, tomatoes, lettuce and onion). After the result of bioassays, the fraction dichloromethane (liquid-liquid extraction) is the fraction that more inhibited the processes evaluated. Due its similarity related to the polarity with dichloromethane fraction from the direct solvent extraction, this latter was submitted to a subdivision sequence in column, HPLC e RMN. It was found three lignans, one of which was the fargesina, these are the majority compounds founded in the *Aristolochia esperanzae* roots, and may be the main substance related to the allelopathic activity of this plant founded in bioassay.

Key words: seed inhibition; root exudation; lignans; fargesin.

Introdução

A alelopatia é definida como uma influência benéfica ou prejudicial, exercida por substâncias liberadas no ambiente pelas plantas, que podem alterar o crescimento e o desenvolvimento de plantas vizinhas ou de microrganismos. Os aleloquímicos estão presentes em todos os órgãos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caule, e sementes (Miller, 1983; Putnan e Tang, 1986). Tais estruturas têm potencial para armazenar estes compostos, porém a quantidade e a via como são emitidos diferem de espécie para espécie (Friedman, 1995). O isolamento, a caracterização estrutural e a avaliação das substâncias com atividades alelopáticas são imprescindíveis para entender as interações ecológicas das plantas (Galindo *et al.*, 1999; Macías *et al.*, 1999; 2007).

Os aleloquímicos podem ser liberados no ambiente por meio de processos ecológicos como a volatilização, a lixiviação, exudação radicular e a decomposição de resíduos de plantas no solo (Rice, 1984; Reigosa, 1999).

A exudação radicular é o processo de liberação dos aleloquímicos que implica na atividade do tecido vivo da planta doadora com a planta receptora comprometendo diretamente suas funções vitais (Bertin *et al.*, 2003). Este processo tem sido pouco estudado, mas é muito importante uma vez que pode ter efeito direto com as raízes de outras plantas ou simplesmente ficar acumulada no solo (Tang e Young, 1982; Yokotani-Tomita, 1998; Reigosa *et al.*, 1999). No entanto, a presença de substâncias no solo pode estar associada ao efeito de microrganismos, onde estes modificariam a toxicidade dos compostos. (Inderjit e Dakshini, 1992; Souto *et al.*, 2000; Inderjit, 2001; 2005).

Diversas espécies como *Hermarthria altissima* (Tang e Young, 1982), *Himatanthus phagedaenicus* (Paranhos *et al.*, 1999) e *Gleichenia pectinata* (Peres *et al.*, 1998) *Triticum aestivum* (Wu *et al.*, 2000) possuem atividade alelopática em suas raízes. Em relação às espécies do cerrado, *Casearia sylvestris* (Imatomi, 2007) e *Andira humilis* (Periotto *et al.*, 2004) demonstraram atividade alelopática de extratos aquosos de suas raízes.

Nos cerrados cerca de cinquenta por cento da vegetação herbácea e subarborescente apresenta órgão subterrâneo espessado, o que sugere a importância

ecológica dessas estruturas (Apezzato-da-Glória, 2003), sendo assim, o processo de exudação radicular pode ser um fator determinante no estabelecimento de certas espécies neste ambiente. Os estudos sobre alelopatia têm sido fundamentais para o entendimento dos processos pelos quais as plantas influenciam outras plantas ao seu redor por meio de liberação de substâncias do metabolismo secundário (Romero *et al.*, 2005).

Aristolochia esperanzae O. Kuntze é uma espécie pertencente à família Aristolochiaceae, conhecida popularmente por papo-de-peru, cachimbo-de turco, mil-homens e jarrinha (Ferri, 1969), e entre as aristolochias é considerada a mais freqüente nos cerrados do Estado de São Paulo (Capellari Jr, 1991).

As raízes da *Aristolochia esperanzae* possuem um revestimento corticoso como um órgão tuberiforme semelhante à xilopódio (Capellari Jr, 1991). Extratos aquosos de suas raízes demonstraram ter inibição sobre a germinação e crescimento de sementes de alface e rabanete, causando anormalidade e morte das plântulas das espécies testadas (Gatti *et al.*, 2004).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi de isolar e caracterizar os metabólitos presentes nas raízes de *Aristolochia esperanzae*, envolvidos na atividade alelopática.

Materiais e método

Material vegetal

Raízes de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze (Aristolochiaceae) foram coletadas no dia 19 de novembro de 2007, em áreas pertencentes à Universidade Federal de São Carlos campus de São Carlos. Após a coleta, as raízes foram lavadas, secas (45°C durante dez dias) moídas e pesadas. Este procedimento foi realizado no “Laboratório de Ecofisiologia e Germinação de Sementes” do Departamento de Botânica.

Os experimentos de análise química e de bioensaios foram realizados no “Laboratório de Química Orgânica” e no “Laboratório de Alelopatia” do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Cádiz (UCA, Espanha). O material biológico foi transportado com autorização do IBAMA (Licença Cites nº 07BR001352/DF).

Extração dos metabólitos das raízes

Para a identificação das substâncias, com atividade alelopática, presentes nas raízes de *Aristolochia esperanzae* foram realizadas dois tipos de extração. Uma que consistiu na obtenção dos extratos a partir do pó das raízes utilizando-se diretamente solventes com polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol) e outra onde primeiramente foi preparado um extrato aquoso do pó das raízes, no qual foi realizada a extração (líquido-líquido) com diclorometano e acetato de etila. Após a passagem dos solventes restou a fração aquosa, a qual também foi testada nos bioensaios. O esquema na figura 1 simplifica e resume a metodologia utilizada para a extração.

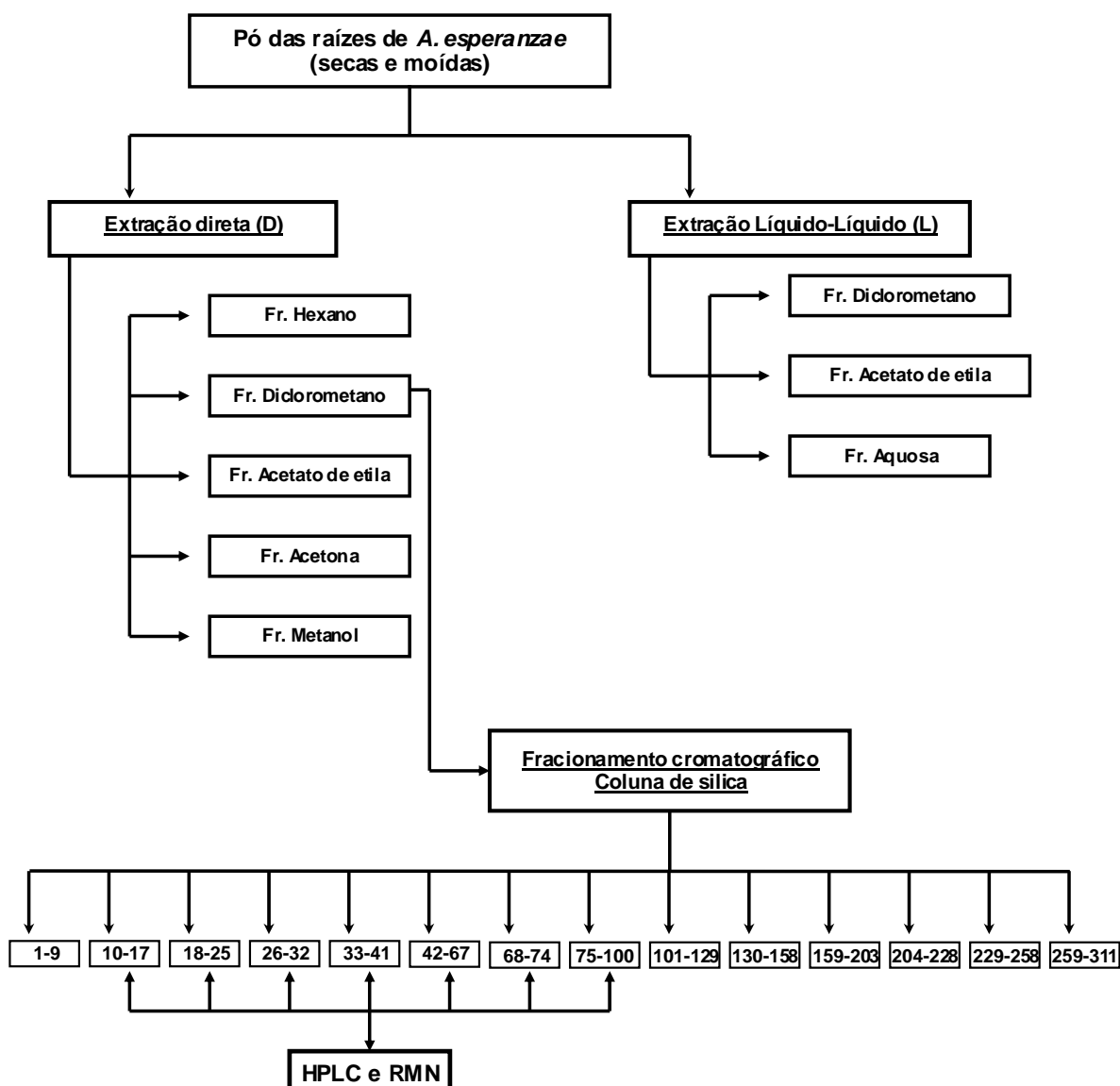


Figura 1 – Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados com o pó das raízes de *A. esperanzae*.

Extração direta (D)

Na extração direta foram utilizados 200g de pó da raiz de *A. esperanzae*, colocados em um becker onde foram adicionados 600 mL de hexano e mantido em ultra-som durante uma hora. Em seguida, este extrato foi filtrado em funil de Buchner acoplado a uma bomba a vácuo e depois evaporado.

Após a extração com o solvente hexano, as raízes passaram pelo mesmo processo com solventes de maior polaridade: diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol.

Assim, as frações obtidas após a filtração foram: fração hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol.

Extração Líquido-líquido (L)

Para extração líquido-líquido foi preparado extrato aquoso com 200 g de raízes diluídos em 600 mL de água destilada. Para melhor rendimento da extração este extrato foi mantido em ultra-som durante 1 hora. Em seguida, foi filtrado e concentrado em rotavapor até obter aproximadamente 300 mL de extrato.

Para esta extração foram utilizados 200 mL do desse concentrado de raízes de *A. esperanzae*, que foram lavados com os solventes diclorometano e acetato de etila, utilizando-se um funil de separação. Durante a passagem de cada solvente nesse concentrado, agitou-se levemente o funil para uma melhor extração. Neste funil foram passados 200 mL de cada solvente e esse processo foi repetido por oito vezes. Em seguida, a mistura foi deixada decantar até a separação de duas fases: a do solvente e a do extrato aquoso. Desta maneira, as fases foram obtidas de cada solvente (diclorometano e acetato de etila) e posteriormente reunidas e secas. Além das frações de diclorometano e acetato de etila, obteve-se também no final do processo a fase aquosa do extrato de *A. esperanzae*.

Com as frações obtidas da extração direta (D) e da extração líquido-líquido (L) foram realizados dois tipos de testes biológicos para determinar quais frações teriam potencial alelopático: bioensaios com coleóptilo e com sementes.

Bioensaio com coleóptilo

Para este bioensaio foram utilizadas plântulas obtidas de sementes de trigo (*Triticum aestivum* var. Pizon) germinadas em placas de petri de 15 cm de diâmetro, com papel de filtro umedecido as quais foram mantidas em estufa a 24° C (± 1) na ausência de luz, durante três dias.

Após o crescimento, as plântulas foram selecionadas e colocadas numa guilhotina de Van der Weij, onde foram descartados 2 mm apicais da parte aérea. Do restante foram cortados segmentos de coleótilos de 4 mm de comprimento e separados para o bioensaio. Estes segmentos foram mantidos em meio nutritivo por uma hora antes de serem utilizados no bioensaio. Todo este procedimento foi realizado sobre luz verde de segurança.

O crescimento dos coleótilos foi realizado em tubos de ensaio contendo solução tampão (pH 5,6) fosfato de potássio (10g de sacarose, 0,525 g de ácido cítrico e 15 g de fosfato dibásico dissolvidos em meio litro de água destilada,) a qual foram adicionadas as frações dissolvidas em Dimetil sulfoxide (DMSO). As frações dissolvidas em DMSO foram diluídas para que nas diferentes concentrações finais a quantidade de DMSO presente fosse igual, e que não ultrapassasse 0.1%. De cada uma das frações testadas foi utilizado 10 mg das frações e com elas foram feitas diluições obtendo-se as concentrações utilizadas nos bioensaios: 800, 400 e 200 ppm. Estas soluções foram colocadas em tubos de ensaios com 2 mL de cada solução e posteriormente foram adicionados cinco coleótilos de trigo. Estes tubos foram colocados em uma centrífuga com rotação de 6 rpm durante 24 horas a 25°C no escuro.

Além dos tubos contendo as frações e suas concentrações foram feitos dois controles, um com água mais DMSO e outro somente com solução tampão. De cada uma das frações (nas diferentes concentrações) e dos controles foram feitas três repetições contendo cinco coleótilos cada. Após 24 horas de crescimento, os coleótilos foram retirados dos tubos de ensaio e medidos com auxílio do programa de digitalização de imagens Photomed.

Bioensaio com sementes

Neste bioensaio com sementes foram utilizados 26 mg de cada uma das frações obtidas e descritas anteriormente. A esta quantidade foi adicionado DMSO para melhor solubilização das frações, e depois adicionado água destilada para obter as concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Para a germinação das sementes, foram utilizadas soluções de um herbicida comercial nas mesmas concentrações adotadas para as frações. Foi empregado o herbicida Logran (composto essencialmente por 59% de terbutrina e 0,6% de triasulfurona).

Após as diluições, 1 mL de cada fração (ou água ou logran) foi colocado em placas de petri plásticas (5 cm de diâmetro) forradas com papel de filtro, onde foram adicionadas 20 sementes de agrião, tomate, alface ou cebola. Estas placas foram tampadas com filme plástico e mantidas em temperatura de 25°C durante quatro, cinco, seis e sete dias, respectivamente, para as sementes de agrião, tomate, alface ou cebola.

Decorrido o tempo específico para a germinação de cada uma das espécies-alvo, elas foram retiradas da estufa e congeladas a 10°C para interromper o crescimento das plântulas até a realização das medidas. As medidas de porcentagem de germinação das sementes e comprimento da raiz e parte aérea das plântulas foram realizadas (programa Fitomed 2.0).

Tratamento dos dados e análise estatística

Os dados de crescimento dos coleótilos, porcentagem de germinação das sementes, crescimento da parte aérea e das raízes das plântulas foram calculados em porcentagens do controle, onde zero indica o mesmo valor do controle, valores positivos indicam estímulo, e valores negativos inibição. Diferenças significativas em relação ao controle foram aferidas utilizando o teste de Tukey com 5% de significância.

Fracionamento

A fração diclorometano (obtida a partir da extração direta) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica, onde foram utilizados como fases móveis uma série de eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano + acetato 20, 30, 40 e 60%, acetato de etila 100%, acetato de etila + acetona 20, 30, 40 e 50% e por último metanol.

As 311 frações obtidas com o fracionamento cromatográfico foram reunidas posteriormente em 14 novas frações (Figura 1) de acordo com observação em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA). Cada cromatoplaça (marca Alugram Sil G/UV₂₅₄ - Macher y Ángel) foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com *Oleum* (solução de 10 mL

de ácido sulfúrico e 200 mL de ácido acético dissolvidos em 40 mL de água) ou em anisaldeído (solução de etanol, anisaldeído, ácido sulfúrico, ácido acético, na proporção 450:25:25:10) e posteriormente aquecidos a 150°C.

Das 14 frações obtidas (Figura 1), sete delas (10-17; 18-25; 26-32; 33-41; 42-67; 68-74 e 75-100) foram preparadas e submetidas a fracionamentos posteriores em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou HPLC (High-performance liquid chromatography) em colunas semi-preparativas e analíticas dependendo da massa de cada fração.

As colunas utilizadas neste trabalho foram denominadas de semi-preparativas (preenchimento Li Chrospher SiO₂, Merck, 7 e 10 µm, dimensões 250 x 10 mm) e analíticas (preenchimento Li Chrospher SiO₂, Merck, 7 , 5 µm, dimensões 250 x 4 mm). O fluxo do eluente foi de 3 mL/min para coluna semi-preparativa e 1 mL/min para a analítica. O HPLC utilizado foi da marca MERCK HITACHI equipado com canais de detecção L-7490. Os solventes foram impulsionados por bombas de 3 canais LaChrom L-7100. Os cromatogramas se processaram mediante o software MERCK HITACHI D-7000.

Posteriormente as amostras obtidas foram submetidas à ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram registrados no equipamento VARIAN INOVA 400 e utilizados solventes deuterados conforme a solubilidade da amostra.

Resultados e discussão

Extração dos metabólitos das raízes

A massa total das frações obtidas a partir de 200 g de pó de raízes com a extração direta com solvente (D) e extração líquido-líquido (L) está apresentada nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Massa total das frações obtidas na extração direta.

Frações	Massa total (g)
Hexano	9.37
Diclorometano	4.24
Acetato de etila	1.84
Acetona	0.51
Metanol	5.17

Tabela 2 – Massa total das frações obtidas na extração líquido-líquido.

Frações	Massa total (g)
Diclorometano (Liq-Liq)	0.3448
Acetato de etila (Liq-Liq)	0.4264

As frações que apresentaram maior massa na extração direta foram as hexano (9,37 g), metanol (4,24 g) e diclorometano (4,24 g) (Tabela 1). As massas obtidas na extração líquido-líquido com os solventes diclorometano e acetato de etila foram bem menores, contendo apenas 0,34 g e 0,42 g respectivamente (Tabela 2).

Bioensaio com coleóptilo

Em relação ao coleóptilo pode-se notar que as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, provenientes da extração direta, inibiram significativamente seu crescimento nas três concentrações testadas. Este fato também foi obtido com as frações diclorometano e acetato de etila provenientes da

extração líquido-líquido. As frações acetona (extração direta) e aquosa (extração líquido-líquido) causaram inibição do crescimento dos coleóptilos somente em concentrações mais elevadas (800 ppm). Além disso, a fração aquosa (extração líquido-líquido) estimulou o crescimento dos coleóptilos na concentração mais baixa (Figura 2).

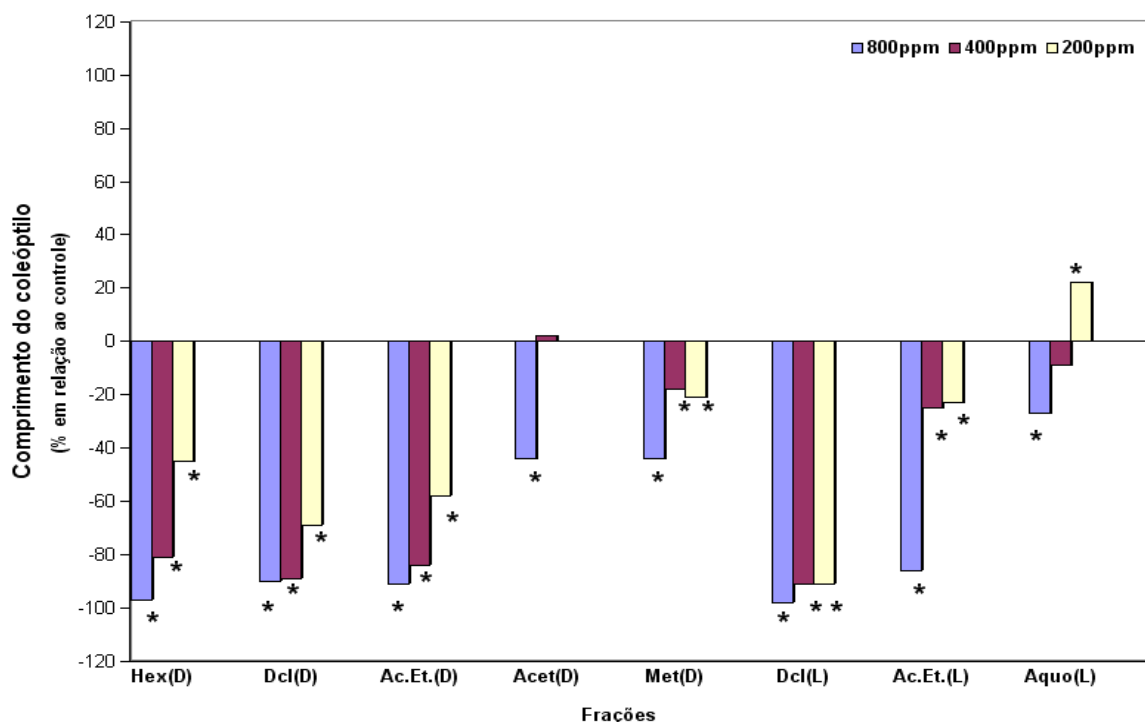


Figura 2 - Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo crescidos durante 24 horas a 25°C no escuro. Fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) da extração direta, e as frações da extração líquido-líquido: Diclorometano (Dcl (L)), Acetato de etila (Ac. Et (L)) e aquoso (Aquo(L)).* indica diferenças significativas em relação ao controle. * indica diferença significativa em relação ao controle – teste de Tukey 5% de probabilidade).

O extrato aquoso na menor concentração causou estímulo (200 ppm) enquanto que a 400 e 800 ppm deste mesmo extrato menor aumento no comprimento dos coleóptilos, caracterizando uma inibição (Figura 2). A maior parte dos compostos orgânicos alelopáticos que são inibitórios em alguma concentração, podem ser estimulantes em menores concentrações (Rice, 1984).

A fração que promoveu maior inibição nos coleóptilos foi a diclorometano proveniente da extração líquido-líquido, alcançando mais de 80% de inibição na menor concentração (200 ppm). Esta inibição pode ser melhor observada quando

comparada com o crescimento dos coleóptilos crescidos em solução tampão (controle com DMSO) (Figuras 2 e 3). Macías *et. al* (2004) identificaram que frações e substâncias isoladas de *Helianthus annuus* também provocaram inibição no comprimento de coleóptilos de trigo.

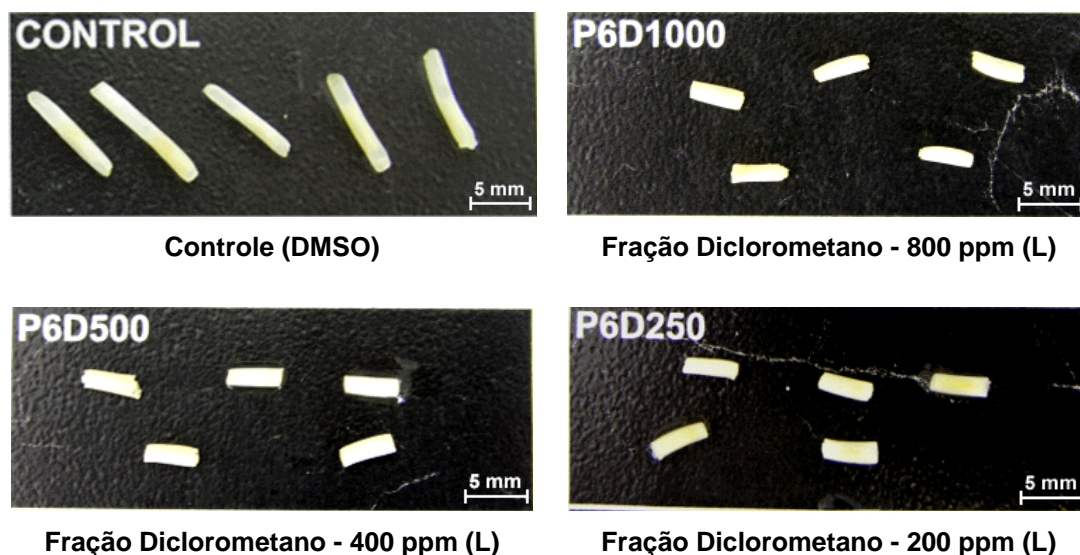


Figura 3 – Inibição dos coleóptilos com o uso da fração diclorometano (extração líquido-líquido - L) em comparação ao controle (com DMSO).

Bioensaio com sementes

Porcentagem de germinação das sementes

Em relação aos bioensaios com sementes, pode-se verificar que a fração diclorometano proveniente da extração líquido-líquido causou maior inibição na porcentagem de germinação de sementes de agrião em relação ao grupo controle. Esta inibição alcançou 87% quando em maior concentração (800 ppm), e 34% a 200 ppm, desde maneira foi dependente da concentração utilizada. Pode-se notar ainda que esta inibição não foi alcançada com o uso do herbicida Logran (Figura 4).

As frações provenientes da extração direta (D) e a fração aquosa (L) em todas as concentrações testadas não alteraram significativamente a porcentagem de germinação de agrião. A fração acetato de etila (L) causou inibição apenas na maior concentração (Figura 4).

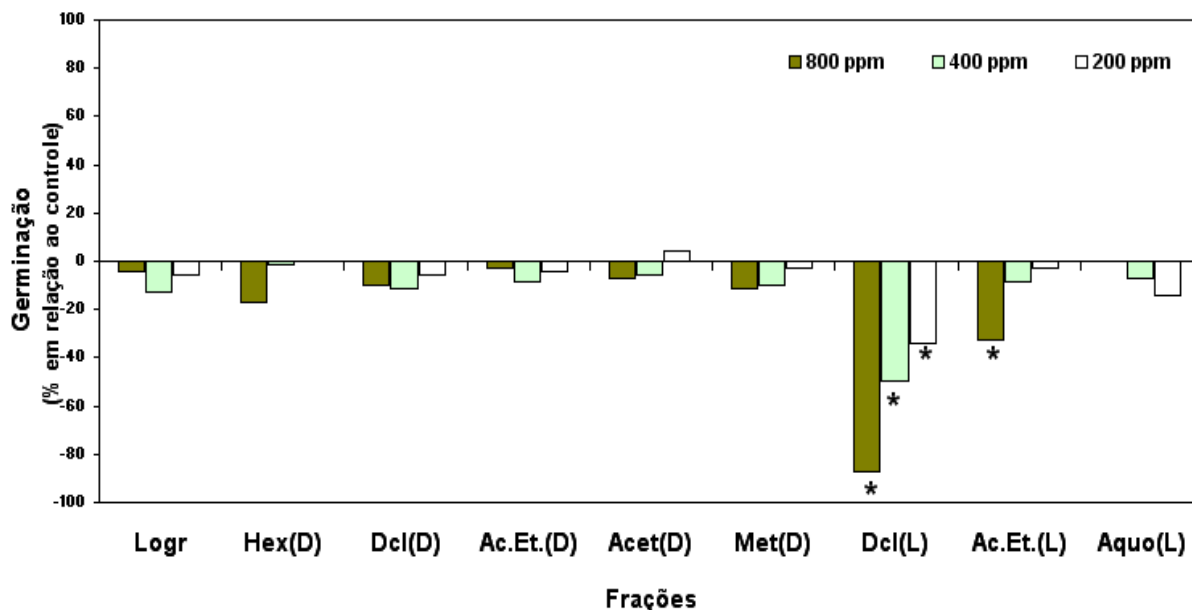


Figura 4 - Porcentagem de germinação de sementes de agrião sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esparanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et (L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Em relação às sementes de tomate pode-se verificar que as frações diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol (D) e também diclorometano, acetato de etila e aquosa (L) causaram inibição na porcentagem de germinação das sementes de tomate em pelo menos duas das concentrações testadas (principalmente nas mais altas). As frações acetona (D) e diclorometano (L) causaram inibição nas três concentrações testadas, sendo que esta última ultrapassou 80% de inibição na concentração de 800 ppm (Figura 5).

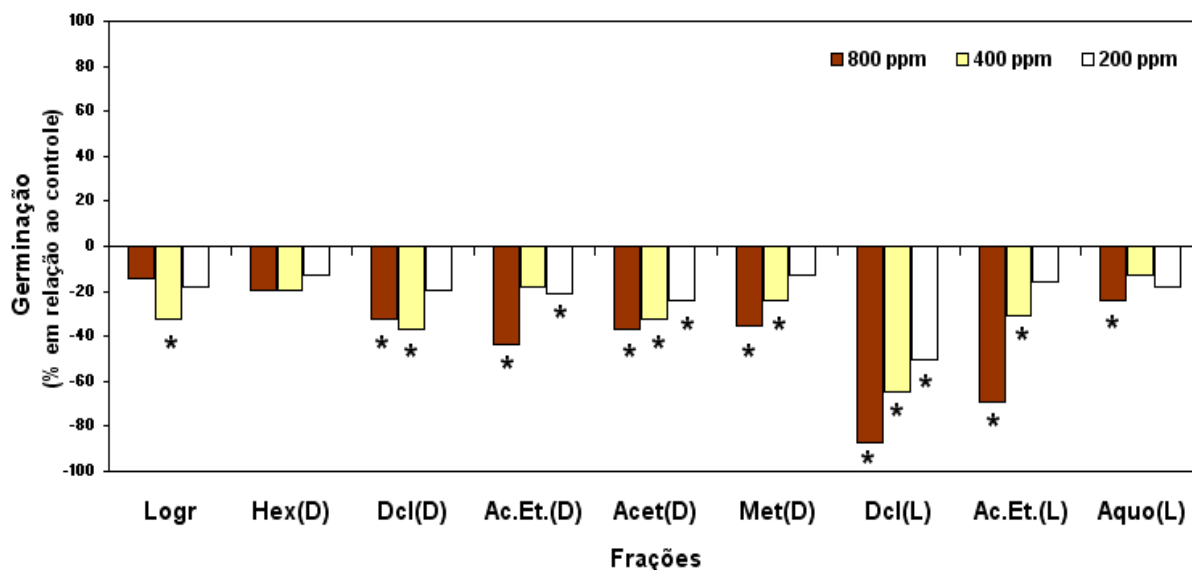


Figura 5 - Porcentagem de germinação de sementes tomate sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

A porcentagem de germinação de sementes de alface foi somente inibida quando utilizadas as frações diclorometano (nas concentrações de 800 e 400 ppm) e acetato de etila (a 800 ppm) ambas provenientes da extração líquido-líquido. Enquanto que a atividade do herbicida Logran se mostrou ativa nas três concentrações testadas (Figura 6).

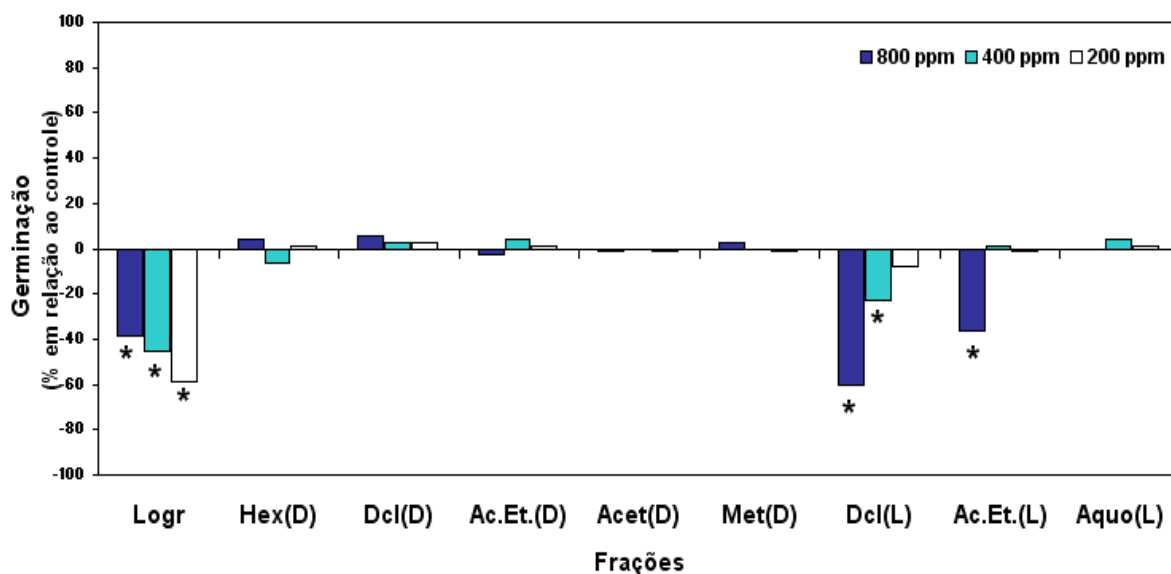


Figura 6 - Porcentagem de germinação de sementes alface sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Em relação às sementes de cebola apenas a fração hexano a 200 ppm, proveniente da extração direta, diminuiu a porcentagem de germinação destas sementes. Para as demais frações e concentrações não houve diferença significativas em relação ao grupo controle (Figura 7).

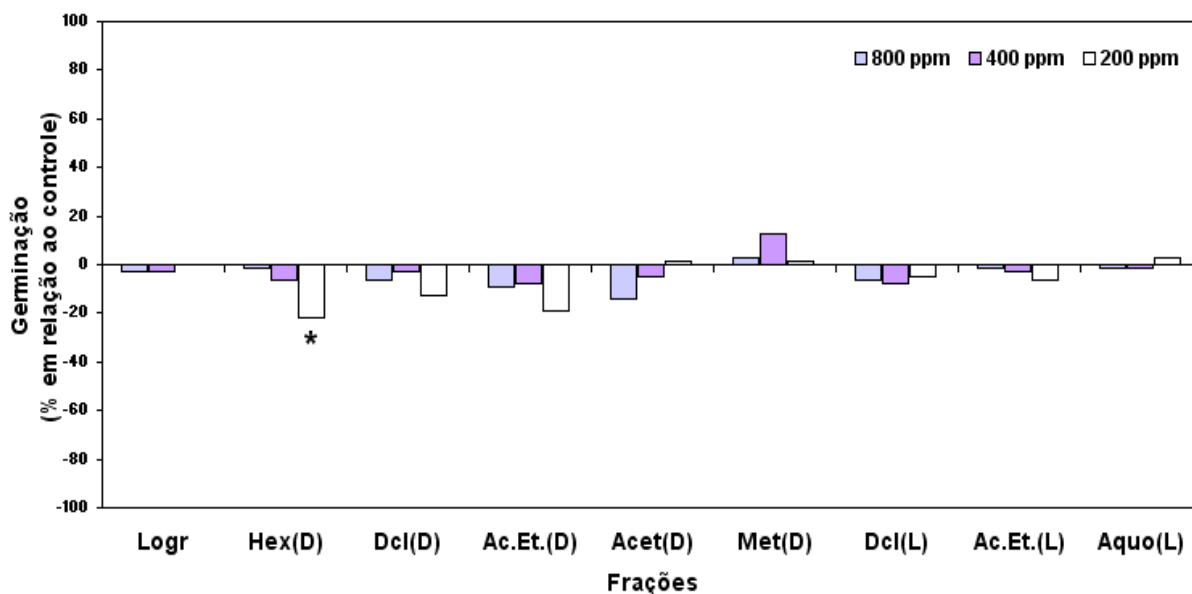


Figura 7 - Porcentagem de germinação de sementes cebola sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Em relação às frações utilizadas neste bioensaio, àquela que mais inibiu a porcentagem de germinação das sementes foi a diclorometano (L). Nas sementes de agrião, tomate e alface esta inibição foi dose-dependente da concentração. Resultados indicando a dependência dos extratos com diferentes concentrações também foram obtidos por Pinã-Rodrigues e Lopes (2001) quando sementes de *Tabebuia alba* foram germinadas na presença de extratos de *Mimosa caesalpiniefolia*.

Diante dos resultados obtidos para o bioensaio de germinabilidade das sementes testadas, pode-se perceber que estas responderam de maneira diferenciada com o uso das frações de extratos de *A. esperanzae*. As sementes de tomate se mostraram mais sensíveis, apresentando inibição da germinabilidade com o uso de todas as frações, com exceção apenas para a extração com hexano. A porcentagem de germinação das sementes de alface e agrião foi inibida somente

com o uso das frações diclorometano e acetato de etila (L). No entanto, as sementes de cebola foram mais resistentes, com inibição somente com o uso da fração hexano (D) a 200 ppm.

A germinação de sementes é o parâmetro mais utilizado nos bioensaios de alelopatia (Ferreira e Áquila 2000) principalmente com o uso de sementes que possuem germinabilidade padronizada. Pelo fato de aleloquímicos serem capazes de inibir a germinação de sementes em laboratório, pode-se inferir que estas substâncias poderão inibir outras espécies em condições naturais.

Respostas distintas obtidas por diferentes espécies receptoras podem garantir que somente certas espécies (mais resistentes aos aleloquímicos) consigam se estabelecer em condições naturais, influenciando a dinâmica das populações. A inibição da germinação das sementes por compostos químicos pode ter uma grande função na regulação da sucessão das plantas (Fenner, 2000). Além disso, o processo de coevolução das espécies pode ter uma relação com os compostos metabólicos pela habilidade de algumas plantas conseguirem se desintoxicar ou metabolizá-los (Seigler, 1996). Em condições naturais, devem ser considerados também todos os outros fatores que podem atuar juntamente com a alelopatia.

Peres *et al.* (1998a, b) também sugerem que a liberação de aleloquímicos por uma espécie doadora pode alterar as estratégias de germinação de uma espécie receptora, uma vez que este aleloquímico pode quebrar a dormência das sementes que permaneceriam no banco de sementes do solo para germinação posterior.

Comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas

Em relação ao crescimento das plântulas de agrião, pode-se verificar que a parte aérea das plântulas foi inibida pelas frações hexano, diclorometano, acetato de etila (D) e a fração acetato de etila (L) predominantemente nas concentrações mais elevadas. Enquanto que a fração diclorometano (L) causou inibição em todas as concentrações avaliadas e foi maior que a inibição produzida com o uso do herbicida com atividade já identificada (Logran) (Figura 8).

As raízes das plântulas de agrião foram inibidas e pode-se verificar que a fração diclorometano causou inibição dependente da concentração utilizada, alcançando 90% de inibição na concentração mais alta em relação ao controle. A

fração acetato de etila também causou inibição (próxima de 20%) com o uso da concentração mais elevada (Figura 8).

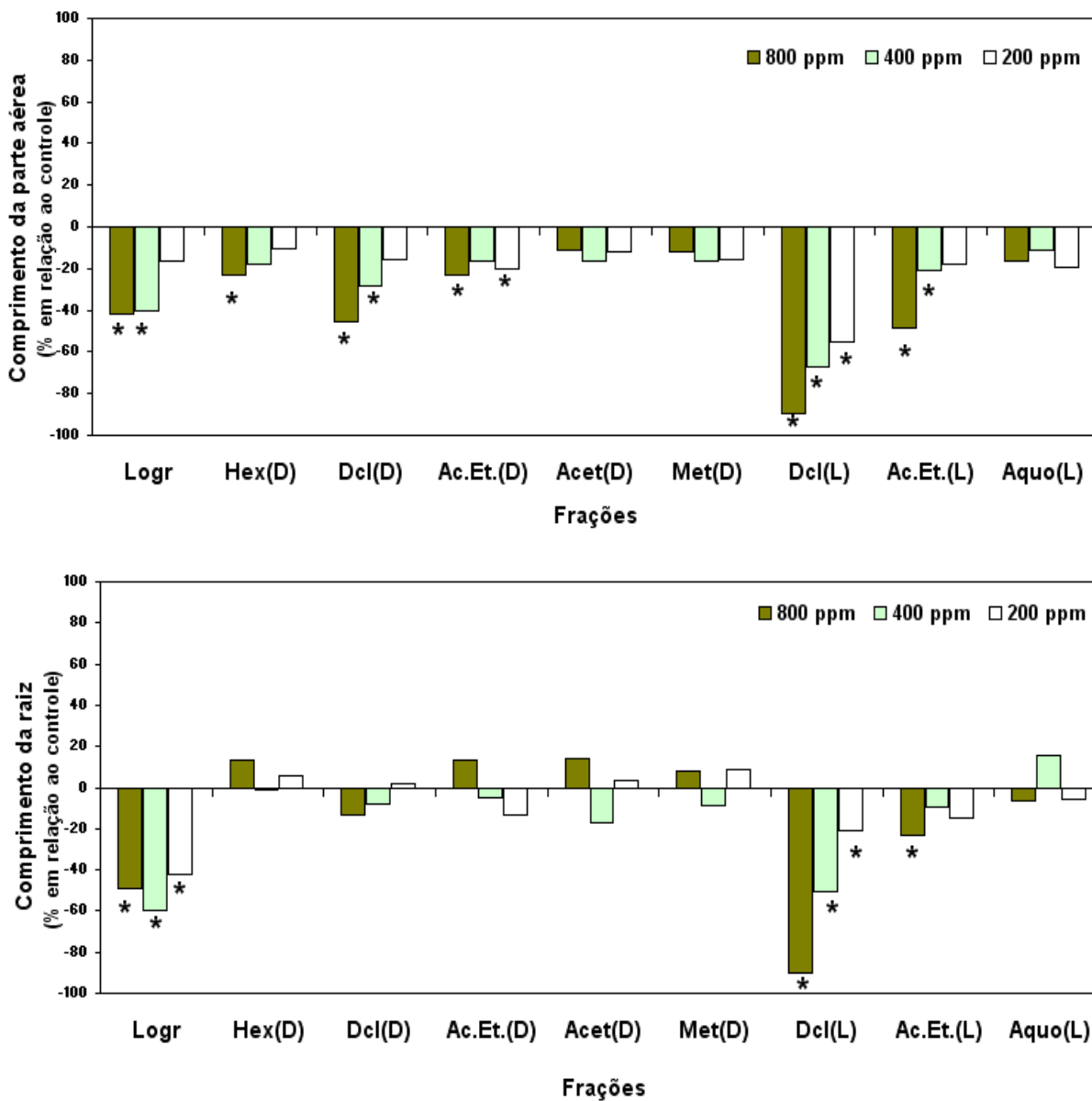


Figura 8 - Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de agrião crescidas durante quatro dias sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Com exceção da fração hexano (a 800 ppm) e aquosa (nas três concentrações), todas as frações e concentrações avaliadas, causaram inibição no crescimento da parte aérea das plântulas de tomate (Figura 9). Em relação ao crescimento das raízes, este fato não diferiu muito, pois somente a fração aquosa a 800 ppm (que estimulou o crescimento das raízes) e a 200 ppm, não causaram inibição no crescimento das raízes de tomate (Figura 9).

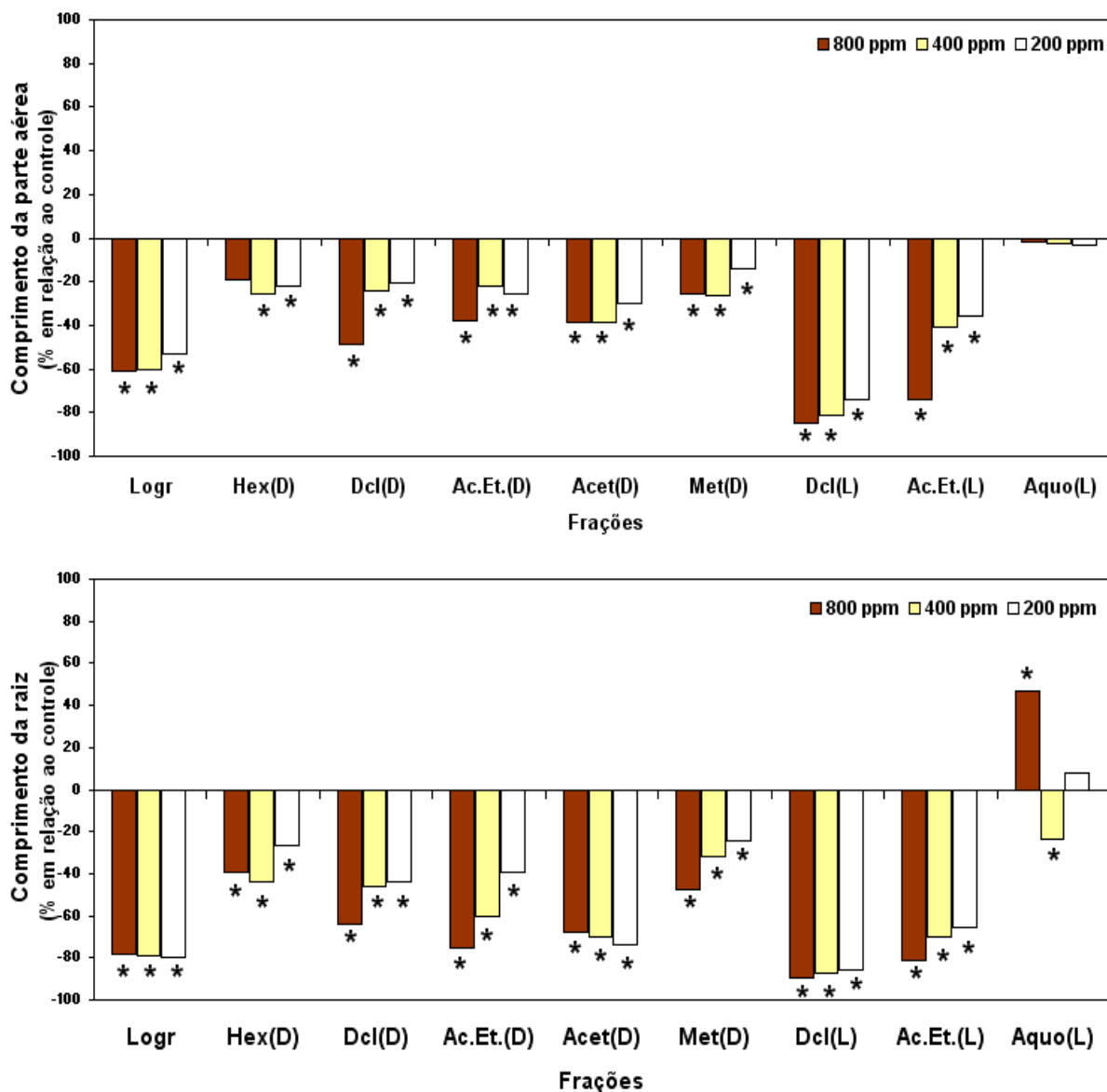


Figura 9 - Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de tomate crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et.(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et.(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

O crescimento das plântulas de alface apresentou uma resposta diferenciada em relação aos parâmetros analisados. Enquanto o crescimento da parte aérea foi inibido, o comprimento das raízes, em alguns casos, foi estimulado dependendo da fração e concentração utilizadas (Figura 10).

As frações que causaram inibição no crescimento da parte aérea das plântulas de alface foram a diclorometano (nas três concentrações) e acetato de etila (a 800 e 400 ppm) ambas provenientes da extração líquido-líquido. No entanto, as frações hexano, diclorometano (a 800, 400 e 200 ppm) e acetato de etila (a 400 e 200 ppm) provenientes da extração direta causaram estímulo no crescimento das raízes. A fração aquosa (a 800 ppm) proveniente da extração líquido-líquido também causou estímulo no crescimento (Figura 10).

No entanto, as frações acetato de etila (extração direta) e diclorometano (extração líquido-líquido) nas três concentrações testadas causaram inibição no crescimento das raízes de alface. Este fato também foi observado com a fração acetato de etila (a 800 ppm) proveniente da extração líquido-líquido (Figura 10).

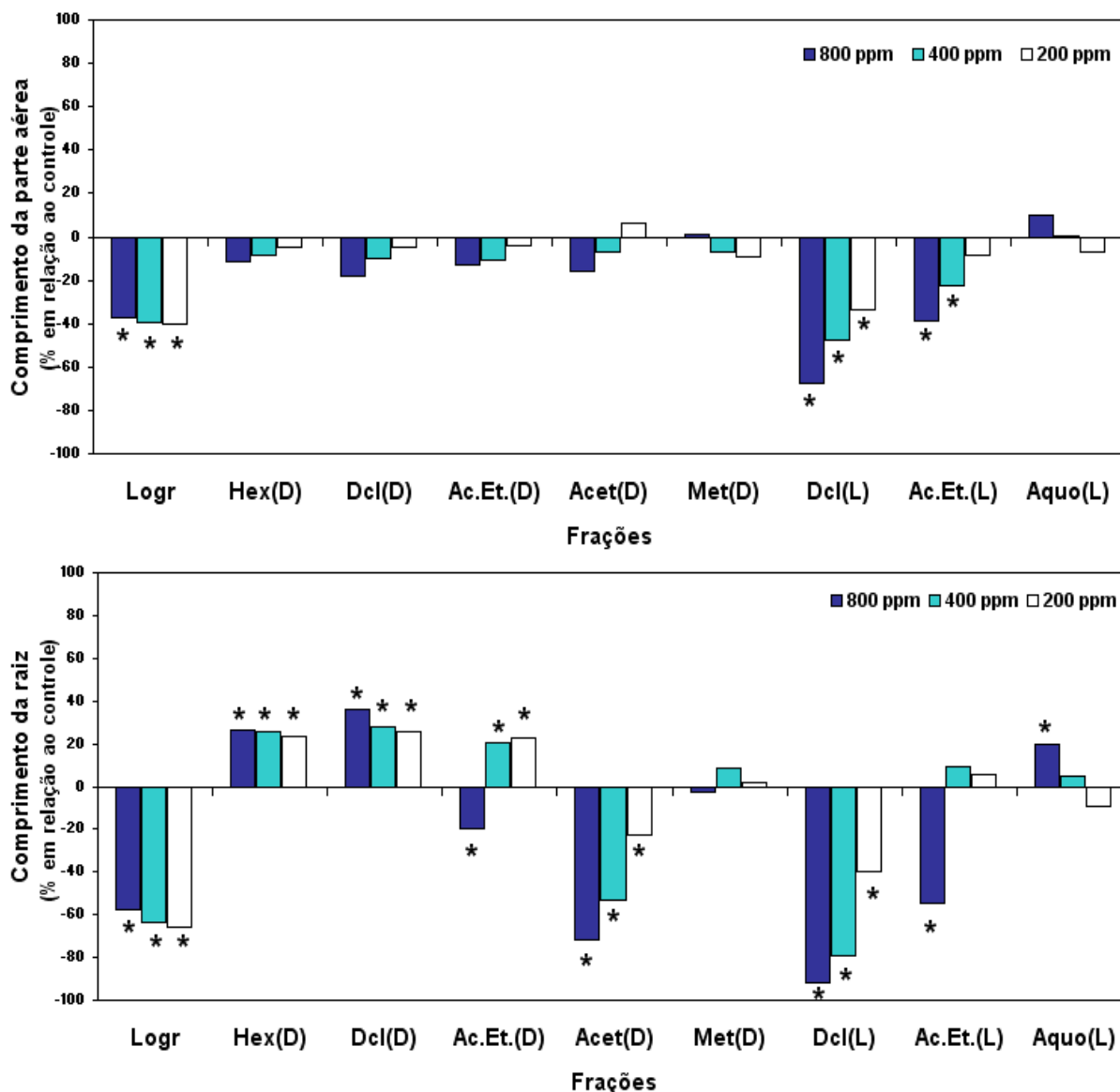


Figura 10 - Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de alface crescidas durante seis dias sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esparanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Na figura 11 é apresentada a porcentagem de crescimento de plântulas de cebola. Pode-se verificar que as frações hexano, dicloromenano e metanol (extração direta) e acetato de etila (extração líquido-líquido) inibiram o crescimento da parte aérea nas concentrações de 400 e 800 ppm. Este fato também foi observado com o uso das frações acetato de etila e acetona (extração direta) e diclorometano (extração líquido-líquido), porém ocorrendo nas três concentrações, sendo inibições próximas a aquelas obtidas com o uso do herbicida.

Em relação às raízes de cebola as frações de acetato de etila e acetona (extração direta) e diclorometano (extração líquido-líquido) foram as que mais inibiram o crescimento das raízes em todos os casos e esta inibição se manteve mesmo com as diluições utilizadas (Figura 11).

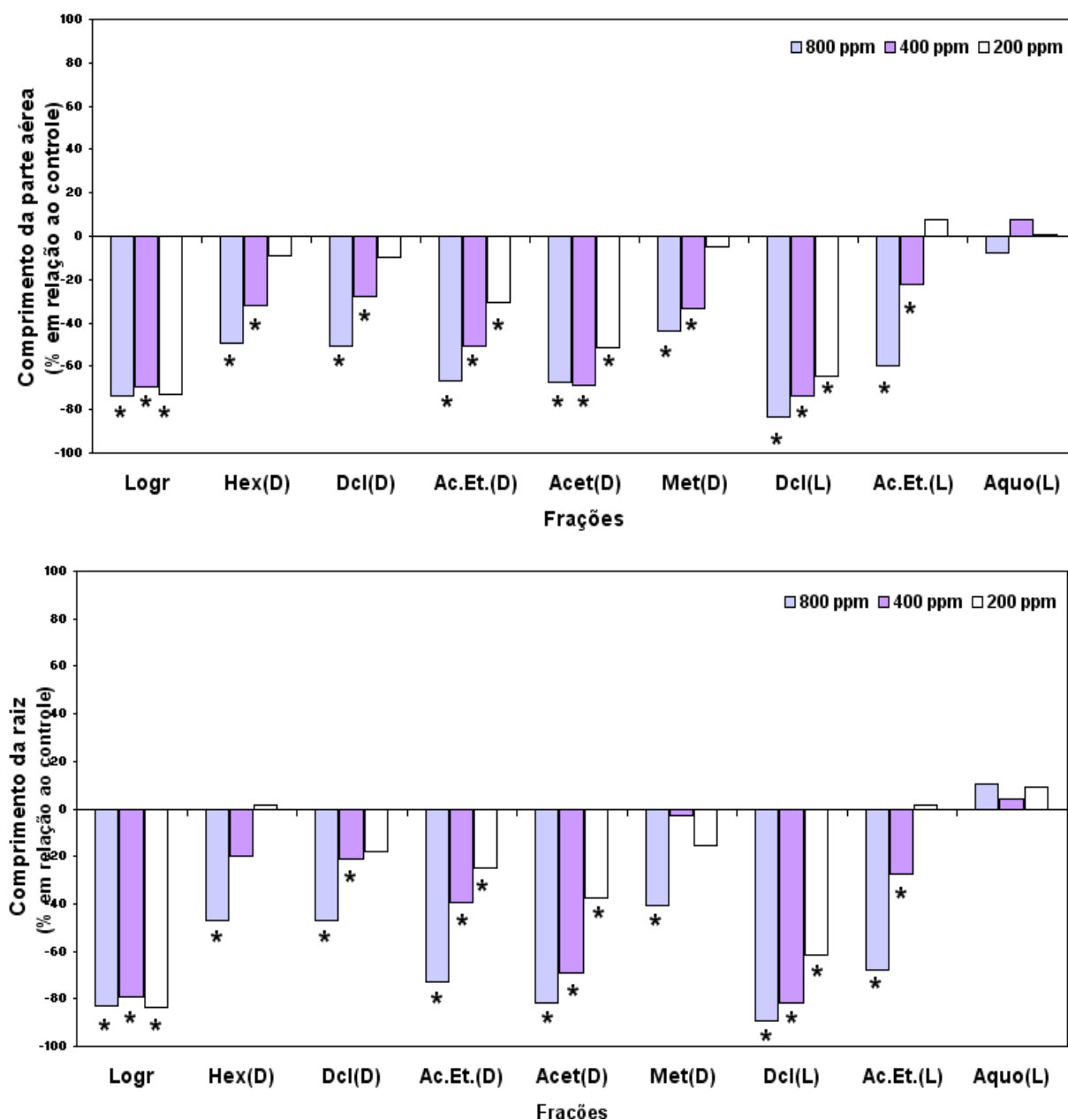


Figura 11 - Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de cebola crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de raízes de *Aristolochia esparanzae*: fração Hexano (Hex(D)), Diclorometano (Dcl(D)), Acetato de etila (Ac.Et(D)), Acetona (Acet(D)) e Metanol (Met(D)) provenientes da extração direta, e as frações Diclorometano (Dcl(L)), Acetato de etila (Ac.Et(L)) e aquoso (Aquo(L)) da extração líquido-líquido. Herbicida Logran (Logr). * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Embora a germinação da semente possa garantir o estabelecimento das espécies em condições naturais, o estágio de estabelecimento das plântulas representa o período mais vulnerável do ciclo de vida da planta (Fenner e Thompson, 2005; Adkins *et al.*, 2007). Sendo que o estabelecimento e sobrevivência destas são eventos cruciais para o crescimento e a manutenção das populações.

As plântulas que se mostraram mais sensíveis em relação ao crescimento de parte aérea e radicular foram as de cebola e tomate. Sendo que, com esta última semente, a fração diclorometano (L) a 200 ppm (menor concentração) inibiu o comprimento das raízes em 86%, e parte aérea em 74% em relação ao grupo controle.

A resposta do crescimento das plântulas é bastante utilizada para comprovar os efeitos alelopáticos em laboratório, e assim ajudar a conhecer as características fisiológicas e bioquímicas que envolvem os mecanismos de ação alelopática. Os principais efeitos dos aleloquímicos estão relacionados aos processos fisiológicos da planta receptora, podendo agir como inibidores da germinação de sementes ou do crescimento, no entanto podem também atuar como promotores de crescimento (Rice, 1984; Fischer *et al.*, 1989; 1990).

Para os resultados obtidos neste trabalho, apesar do crescimento das raízes de alface e tomate terem sido estimulados, a maioria das frações e concentrações utilizadas causou forte inibição no crescimento das plântulas. Sendo que, a fração que promoveu maior inibição nos comprimento de parte aérea e raízes das plântulas utilizadas foi a diclorometano proveniente da extração líquido-líquido.

Fracionamento

Diante dos resultados obtidos nos bioensaios de coleóptilo de trigo e de sementes, pode-se verificar que a fração diclorometano proveniente da extração líquido-líquido (L) foi aquela que apresentou maior inibição nos processos biológicos analisados. A fração diclorometano obtida com a extração direta em solvente (D) também apresentou atividade e as duas possuem substâncias em comum observadas por cromatografia delgada analítica. Sendo assim, por se apresentar mais pura e possuir maior massa a fração diclorometado (D) foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica com a finalidade de isolar e identificar as

substâncias com atividade alelopática presente nas raízes de *Aristolochia esperanzae*.

Fração diclorometano (D)

Para o fracionamento da fração diclorometano obtida com extração direta foi utilizada sílica gel como fase móvel e uma série de eluentes em ordem crescente de polaridade. Sendo assim, foram obtidas 311 frações reunidas em 14 novas frações (de acordo com sua similaridade com monitoramento de cromatografia de camada delgada analítica). As frações estão numeradas de acordo com o esquema apresentado na figura 1, e as massas obtidas para cada uma delas estão na tabela 3.

Tabela 3 - Frações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano obtida com a extração direta.

Frações	Massa (g)
1-9	0,165
10-17	1,417
18-25	0,350
26-32	0,203
33-41	0,152
42-67	0,153
68-74	0,059
75-100	0,259
101-129	0,088
130-158	0,176
159-203	0,110
204-228	0,032
229-258	0,035
259-311	0,370

As frações de 1-9, 10-17, 18-25, 26-32, 33-41, 42-67, 68-74 foram analisadas (HPLC e RMN), obtendo os resultados a seguir:

Fração 1-9

A fração 1-9 não apresentou substâncias (em CCDA) e por isso não foi submetida a outros fracionamentos.

Fração 10-17

A fração 10-17 foi submetida ao fracionamento em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 7%), obtendo-se três novas frações denominadas 23, 24, 25 (Tabela 4).

Fração 23: purificada em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 7%) obtendo-se os produtos 26, 27, 28 e 29 (Tabela 4).

Fração 24: purificada em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 7%) obtendo-se os produtos 30 e 31 (Tabela 4).

Fração 25: purificada em HPLC (coluna analítica com eluente hexano:acetato de etila 7%) obtendo-se os produtos 32, 33 e 34 (Tabela 4).

Os espectros de RMN-H¹ das frações 23, 24 e 25 e dos produtos 27, 31 e 33 estão em anexo.

Tabela 4 – Frações e massas obtidas em HPLC a partir da fração 10-17 (proveniente da fração diclorometano). Hex: hexano; AcOEt: Acetato de etila.

Fração diclorometano	Frações	Massa	Purificação em HPLC / Eluente	Produtos obtidos
10-17 →	23	0,0340g	Coluna semi-preparativa / Hex:AcOEt 7%	→ 26, 27, 28, 29
	24	0,0252g	Coluna semi-preparativa / Hex:AcOEt 7%	→ 30, 31
	25	0,0070g	Coluna analítica / Hex:AcOEt 7%	→ 32, 33, 34

Fração 18-25

A fração 18-25 foi submetida ao fracionamento em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente de hexano:acetato de etila 7%), obtendo-se nove frações

(denominadas 35 a 44) sendo que três foram submetidas a novos fracionamentos (37, 41 e 42) conforme indicado na tabela 5.

Fração 37: purificada em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 10%) obtendo-se os produtos 49 e 50 (Tabela 5).

Fração 41: purificada em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 10%) obtendo-se os produtos 47 e 48.

Fração 42: purificada em HPLC (coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 10%) obtendo-se os produtos 45 e 46 (Tabela 5).

Os espectros de RMN- H^1 das frações 37, 41 e 42 e dos produtos 46, 48 e 50 estão em anexo.

Tabela 5 - Frações obtidas em HPLC a partir da fração 18-25 (proveniente da fração diclorometano). Hex: hexano; AcOEt: Acetato de etila.

Fração diclorometano	Frações	Massa	Purificação em HPLC / Eluente	Produtos obtidos
18-25 →	37	0,0248g	Coluna semi-preparativa / Hex:AcOEt 10%	→ 49, 50
	41	0,0461g	Coluna semi-preparativa / Hex:AcOEt 10%	→ 47, 48
	42	0,0395g	Coluna semi-preparativa / Hex:AcOEt 10%	→ 45, 46

Fração 33-41

A fração 33-41 foi submetida ao fracionamento em HPLC (em coluna semi-preparativa com eluente hexano:acetato de etila 10%), obtendo-se cinco novas frações denominadas 51, 52, 53, 54, 55. O espectro de RMN- H^1 da fração 53 está em anexo.

Fração 42-67

A fração 42-67 foi submetida ao fracionamento em HPLC (em coluna semi-preparativa com eluente de hexano:acetato de etila 10%), obtendo-se três novas

frações denominadas 56, 57 e 58. O espectro de RMN-H¹ da fração 57 está em anexo.

Fração 68-74

A fração 68-74 foi submetida ao fracionamento em HPLC (em coluna semi-preparativa com eluente de hexano:acetato de etila 15%), obtendo-se quatro novas frações denominadas 59, 60, 61, 62. Os espectros de RMN-H¹ das frações 60 e 62 estão em anexo.

Fração 75-100

A fração 75-100 por se tratar de uma fração cristalizada e se apresentar mais purificada foi submetida ao fracionamento em HPLC (em coluna semi-preparativa com eluente de hexano:acetato de etila 40%), obtendo-se seis produtos que se encontram purificados, porém estão em fase de identificação e aplicação em bioensaios do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Cádiz (UCA, Espanha).

Identificação dos produtos presentes nas frações

- Esteróides

De acordo com a análise dos espectros, pode-se identificar que os produtos 23, 24, 25, 27, 31 e 33 (provenientes da fração 10-17) e os produtos 57 e 60 (provenientes da fração 42-67 e 68-74 respectivamente) tratam-se de um mesmo composto pertencente à classe dos esteróides. Embora as frações e os produtos 37, 41, 42, 46, 48, 50 e 53 sejam provenientes de frações distintas também pertencem à classe dos esteróides.

Esteróis e triterpenos são classes de terpenóides (isoprenóides) encontrados nos vegetais (Jordon-Thaden e Louda, 2003). Os esteróides produzidos pelas plantas estão envolvidos no crescimento das plantas como reguladores de

crescimento, além de atuar na divisão e expansão celular, no crescimento do tubo polínico, alongação de entrenó, na ativação das bombas de prótons e inibição do crescimento de raízes (Bramley, 1997; Schaeffer *et al.*, 2001; Schaller, 2003; Kerbauy, 2004). Os esteróides estão presentes na composição estrutural das membranas celulares, regulando a sua fluidez e permeabilidade (Demel e Kruff, 1976; Schrick *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2003; Schaller, 2003, 2004).

Muitos estudos com plantas mutantes, principalmente *Arabidopsis thaliana*, vêm ajudando a demonstrar o papel dos esteróides nas plantas, como por exemplo, na alteração da biossíntese e/ou distribuição de fitormônios como o ácido abscísico (Stillwell *et al.*, 1990), etileno e auxina (Souter *et al.*, 2002; Lindsey, 2003; Willensen *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2008).

Alguns esteróides isolados de plantas demonstraram atividade alelopática, como é o caso de amasterol isolado das raízes de *Amaranthus viridis* L. que inibiu a germinação e o crescimento de plântulas de alface (Roy *et al.*, 1982). Kpoviéssi *et al.* (2008) identificaram e isolaram esteróides e triterpenos da parte aérea de *Justicia anselliana* e demonstraram que estes compostos inibiram a germinação de sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*).

Terpenos e esteróides foram isolados de espécies de *Melilotus* e também apresentaram atividade fitotóxica e alelopática (Macías *et al.* 1997). Macías *et al.* (2006) isolaram os esteróis 7-oxo-estigmasterol, estigmasterol e β -sitosterol de arroz (*Oryza sativa*) que apresentaram atividade alelopática sobre a erva invasora *Echinochloa crus-galli*.

- Lignanas

Os produtos identificados na fração 62 pertencem ao grupo das lignanas, entre elas está a fargesina.

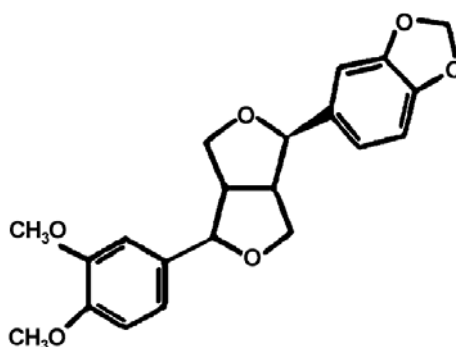


Figura 12 – Estrutura da lignana fargesina encontrada nas raízes de *Aristolochia esperanzae*. (Anaya, 2003).

As lignanas são substâncias derivadas do metabolismo secundário e biossintetizadas pela via do ácido chiquímico que ocorre pela condensação oxidativa de álcoois cinâmílicos entre si e com os ácidos cinâmicos (Ward, 1995).

O elevado número de lignanas e neolignanas distribuídas no reino vegetal leva a suposição de que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam essenciais ao desenvolvimento do vegetal e ao controle deste sobre a vida circunjacente (Ward, 1993), e também devem desempenhar um papel importante na adaptação ecológica das plantas terrestres (Gottlieb e Yoshida, 1984). Além disso, foi constatado que as lignanas são acumuladas em madeira em resposta a ferimentos mecânicos ou a invasão de fungos ou bactérias (Chen *et al.*, 1976).

Nas folhas de *Aristolochia esperanzae* já haviam sido identificadas duas lignanas, no entanto, em suas raízes foram isolados apenas diterpenos (Lopes *et al.*, 1988; Lopes e Bolzani, 1988).

Macías *et al.* (2004) identificaram dez lignanas e um fenilpropanóide isolados de girassol (*Helianthus annuus*) com atividade fitotóxica na germinação de sementes de agrião, trigo e tomate, sendo que esta última espécie foi a mais sensível em relação aos compostos analisados. Da mesma maneira, as sementes de tomate utilizada neste trabalho também se mostraram bastante sensíveis às frações obtidas das raízes de *A. esperanzae* (Figuras 5 e 9).

Borges *et al.* (2007) identificaram que duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (surinamesina e virolina) foram as substâncias responsáveis pela atividade alelopática desta espécie sobre o crescimento e a germinação de três espécies invasoras, sendo que a surinamesina apresentou maior atividade.

Em relação à substância fargesina, ainda não haviam sido encontrados relatos sobre a atividade fitotóxica específica desta substância.

Desta maneira, pode-se inferir que dentre os compostos isolados nas raízes de *Aristolochia esperanzae*, os esteróides juntamente com as lignanas (fargesina) podem ser os principais compostos responsáveis pela atividade alelopática encontrada nesta planta. Eles podem atuar isoladamente ou em conjunto, potencializando a atividade alelopática encontrada nos bioensaios. Muitas vezes, a ação de uma substância pode ser potencializada pela presença de outra, agindo em sinergia, uma vez que a alelopátia raramente acontece com a atividade de um único composto (Ferreira, 2005).

Sendo assim, como as frações purificadas das raízes de *A. esperanzae* comprovaram ter potencial fitotóxico, pode-se inferir que esta espécie possa influenciar a sucessão de plantas nos campos cerrados por meio da exudação radicular, uma vez que *Aristolochia. esperanzae* é uma espécie amplamente distribuída neste ambiente.

Conclusões

Diante dos fracionamentos realizados com o extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*, pode-se concluir que:

- A fração que promoveu maior inibição nos coleótilos, germinação das sementes e crescimento das plântulas utilizadas foi obtida com diclorometano proveniente da extração líquido-líquido.

- As sementes de tomate se mostraram mais sensíveis, apresentando inibição da germinação com o uso de todas as frações (com exceção apenas para hexano). Enquanto, as sementes de cebola foram mais resistentes ao uso das frações obtidas no fracionamento.

- Para as sementes de agrião, tomate e alface a inibição da germinabilidade foi dose-dependente da concentração da fração diclorometano (L).

- As plântulas que se mostraram mais sensíveis em relação ao crescimento de parte aérea e radicular foram as de cebola e tomate.

- A fração 75-100 se apresentou cristalizada e mais purificada, e nela foram obtidos seis produtos que se encontram em fase de identificação na Universidade de Cádiz (UCA, Espanha).

- Em outras frações com atividade alelopática foram identificadas substâncias pertencentes ao grupo dos esteróis e das lignanas, sendo uma delas a fargesina. Estes seriam os compostos majoritários presentes nas raízes de *Aristolochia esperanzae*, possivelmente responsáveis pela atividade alelopática encontrada nesta espécie.

Referências bibliográficas

- ADKINS, S.W.; ASHMORE, S.E.; NAVIE, S.C. (2007). *Seeds: biology, development and ecology*. Cambridge: CAB International. 440p.
- ANAYA, A.L.(2003). *Ecología Química*. Publ. Plaza y Valdes, 349p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (2003). *Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil*, Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 80p.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256: 67-83.
- BORGES, F.C.; SANTOS, L.S.; CORRÊA, M.J.C.; OLIVEIRA, M.N. SOUZA-FILHO, A.P.S. (2007). Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). *Planta Daninha*, 25(1):55-59.
- BRAMLEY, P.M. (1997). Isoprenoid Metabolism p. 417-434. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. *Plant biochemistry*, Academic Press, California, USA, 554p.
- CAPELLARI Jr., L. (1991). *Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo*. Campinas, Universidade de Campinas (Dissertação de Mestrado).
- CHEN, C-L; CHANG, H-M.C.; COWLING, E.B.; HSU, C-Y.H.; GATES, R.P. (1976). Aporphine alkaloids and lignans formed in response to injury of sapwood in *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry*, 15(7): 1161-116.
- DEMEL, R.A.; KRUYFF, B.D. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 457: 109–132.
- FENNER, M. (2000). *Seeds - The Ecology of regeneration in plant communities*. New York, CABI Publishing, 410p.
- FENNER, M; THOMPSON, K. 2005. *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press. 250p.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 175-204, Edição Especial.
- FERREIRA, A.G. (2005). Alelopatia: sinergismo e inibição. p. 433-440. In Nogueira, R.J.M.C.; Araújo, E.L.; Willadino, L.G.; Cavalcante, U.M.T. (eds). *Estresses Ambientais: danos e benefícios em plantas*. Recife. UFRPE, Imprensa Universitária. 500p.
- FERRI, M. G. (1969). *Plantas do Brasil e do cerrado*. São Paulo: Edgard Blücher, 239p.
- FISCHER, N.H.; WEIDENHAMER, J.D.; RIOPEL, J.L.; QUIJANO, L.; MENELAOU, M.A. (1990). Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry*, 29(8): 2479-2483.

- FISCHER, N.H.; WEIDENHAMER, J.D; BRADOW, J. M. (1989). Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. *Phytochemistry*, 28(9): 2315-2317.
- FITOMED 2.0. – *Bioassays online*. SECA Eletricidad e Universidade de Cadiz, Espanha (www-ias.uca.es/fitomed.htm)
- FRIEDMAN, J. (1995). Allelopathy, autotoxicity, and germination. p. 629-644. *In*: J. KIGEL; G. GALILI. (eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker. 853p.
- GALINDO, J.C.; HERNADEZ, A. DAYAN, F.E, TELLEZ, M.R. MACÍAS, F. PAUL, R.N.; DUCKE, S.O. (1999). Dehydrozaluzalim C a natural sesquiterpenoide, causes rapid plasma membrana leakage. *Phytochemistry*, 52 805 - 813- 717,
- GATTI, A.B., PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. (2004). Atividade Alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasílica*, 18(3): 459-472.
- GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M. (1984). Lignóides, com atenção especial à química das neolignananas. *Química Nova*, p. 250-273.
- IMATOMI, M. (2007). *Interferência de fatores bióticos e abióticos na propagação e conservação de Casearia sylvertris SWARTZ (Salicaceae)* 117 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- INDERJIT. (2005). Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil*, 274: 227-236.
- INDERJIT; ASAKAWA, C. (2001). Nature of interference potential of hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) to radish (*Raphanus sativus* L.): does allelopathy play any role? *Crop Protection*, 20: 261-265.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. (1992). Interference potential of *Pluchea lanceolata* (asteraceae): growth and physiological responses of asparagus bean, vigna unguiculata var. sesquipedalis. *American Journal of Botany*, 79(9): 977-981.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. (1995). On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*, 61(1): 28-44.
- JORDON-THADEN I.E.; LOUDA S.M. (2003). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 1353–1396.
- KERBAUY G.B. (2004). *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 452p.
- KPOVIÉSSI, D. S. S.; GBAGUIDI, F.; GBÉNEOU, J. D.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M. R.; HUBERT, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. (2008). Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Ness) T. Anders by capillary gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48:1127-1135.

- LINDSEY K.; PULLEN M.L.; TOPPING J.F. (2003). Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signaling. *Trends in Plant Science* 8 (11): 521-525.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V. 1988(a). Lignans from Brazilian Aristolochiaceae. *Revista Latinoamericana de Química*, 19(3-4): 113-117.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S. 1988(b). Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. *Phytochemistry*, 27(7): 2265-2268.
- MACÍAS, F.A.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R.; MOLINILLO, J. (2006). Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. *Steroids*, 71:603-608.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.; GALINDO, C.G. (2007). Evaluation and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, 68: 2917-2936.
- MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. (2004). Bioactive lignans from a cultivar of *Helianthus annuus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6443-6447.
- MACÍAS, F.A.; SIMONET, A.; GALINDO, J. (1997). Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *Journal of Chemical Ecology*, 23 (7):1781-1803.
- MACÍAS, F.A.; SIMONET, A.M. GALINDI, J.C.G., CASTELANI, D. (1999). Bioactive phenolic and polar compound from *Memimlotus messanensis*. *Phytochemistry*, 50: 35-46.
- MEN S.; BOUTTÉ Y.; IKEDA Y.; LI X.; PALME K.; STIERHOF Y.D.; HARTMANN M.A.; MORITZ T.; GREBE, M. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biology*, 10:237-244.
- MILLER, D.A. (1983). Allelopathic effects of alfafa. *Journal of Chemical Ecology*, 9(8): 1059-1072.
- PARANHOS, M.V.; NAGEM, T.J.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, T.T.; QUEIROZ, M.E.L.R. 1999. Estudos alelopáticos dos constituintes químicos isolados das raízes de *Himatanthus phagedaenicus* (MART.) WOODSON. *Revista da Pesquisa & Pós-graduação*, 1(2): 5-9.
- PERES, M.T.L.P.; PIZZOLATTI, M.G.; QUEIROZ, M.H.; YUNES, R.A. (1998). Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (PR.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(2): 131-137.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. (2004). Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, 18:425-430.
- PHOTOMED - PhotoMed Technologies, Inc.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. (2001). Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. *Floresta e Ambiente*, 8(1): 130-136.

- PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. (1986). Allelopathy: state of the science. p. 1-19. In: A.R. PUTNAM; C.S. TANG. *The science of allelopathy*. New York, John Wiley & Sons. 357p.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science*, 18(5): 577-608.
- RICE, E. L. (1984). Allelopathy. New York, Academic Press. 353 p.
- ROMERO, R.T; NIETO, S. S ; BADILLO, S.J; ANAYA, A.L.; ORTEGA, R.C. (2005). Comparative effects of allelochemicals and water stress in roots of *Lycopersicon sculentum* Mill, solanaceae. *Plant Science*, 168:1059-1660.
- ROY, S.; DUTTA, A. K.; CHAKRABORTY, D.P. (1982). Amasterol, an ecdysone precursor and a growth inhibitor from *Amaranthus viridis*. *Phytochemistry*, 21 (9): 2417-2420.
- SCHAEFFER, A.; BRONNER, R.; BENVENISTE, P.; SCHALLER, H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by sterol methyltransferase 2;1. *The Plant Journal*, 25: 605–615.
- SCHALLER, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* 42: 163–175.
- SCHALLER, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 465–476.
- SCHRICK, K.; MAYER, U.; HORRICH, A.; KUHN, C.; BELLINI, C.; DANGL, J.; JÜRGENS, G. (2000). Fackel is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Development*, 14: 1471–1484.
- SEIGLER, D. S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- SOUTER M.; TOPPING J.F.; PULLEN M.; FRIML J.; PALME K.; HACKETT R.; GRIERSON D.; LINDSEY K. (2002). Hydra mutants of *Arabidopsis* are defective sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* 14: 1017–1031.
- SOUTO, C.; CHIAPUSIO, G.; PELLISSIER, F. (2000). Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9): 2025-2034.
- STILLWELL W.; CHENG, Y.F.; WASSALL, S. R. (1990). Plant sterol inhibition of abscisic acid-induced perturbations in phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1024(2):345-51.
- TANG, C.S.; YOUNG, C.C. (1982). Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of *Bigalita limpograss* (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiology*, 69: 155-160.
- WARD, R.S. (1993). Lignans, neolignans, and related compounds. *Natural Product Reports*, 10: 183-205.

- WARD, R.S. (1995). Lignans, neolignans, and related compounds. *Natural Product Reports*, 12(83): 43-74.
- WILLENSEN V.; FRIML J.; GREBE M.; TOORN A. V. D; PALME K; SCHERES B. (2003). Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require sterol methyltransferase 1 function. *Plant Cell*, 15:612-625.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. (2000). Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9): 2141-2154.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. (1998). Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, 47(1): 1-2.

Conclusões gerais

▪ Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando os diferentes extratos de espécies do cerrado coletados em estações seca e chuvosa pode-se concluir que:

- Extratos de *Davilla elliptica* e *Miconia albicans* foram os que inibiram significativamente a germinabilidade das sementes de alface, quando a coleta das folhas destas espécies foi realizada no período seco.

- Extratos de cinco espécies (*Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa*) atrasaram a germinação das sementes de alface e gergelim, quando suas folhas foram coletadas no período de seca.

Desta forma, pode-se concluir que para as espécies estudadas, em geral houve maior atividade alelopáticas com o uso de extratos de folhas coletadas no período da seca.

▪ Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando os extratos de folhas, caule e raízes de *Aristolochia esperanzae* sob a germinação e crescimento de gergelim, pode-se observar que:

- Os extratos de raiz de *A. esperanzae* foram os que proporcionaram maior efeito inibitório, provocando alterações morfológicas e diminuição no crescimento e desenvolvimento das plântulas de gergelim.

- Dentre os extratos dos diferentes órgãos utilizados, os de raiz foram os que mais inibiram a germinação.

- A inibição obtida nas sementes de gergelim com o uso dos extratos foi dependente da concentração utilizada.

- Os extratos inibiram o crescimento das raízes de gergelim e esta inibição aconteceu pela diminuição na elongação das células radiculares do metaxilema das raízes da espécie-alvo.

▪ Diante dos fracionamentos realizados com o extrato de raízes de *Aristolochia esperanzae*, pode-se concluir que:

- A fração que promoveu maior inibição nos coleótilos, germinação das sementes e crescimento das plântulas utilizadas foi obtida com diclorometano proveniente da extração líquido-líquido.

- As sementes de tomate se mostraram mais sensíveis, apresentando inibição da germinação com o uso de todas as frações (com exceção apenas para hexano). Enquanto, as sementes de cebola foram mais resistentes ao uso das frações obtidas no fracionamento.

- Para as sementes de agrião, tomate e alface a inibição da germinabilidade foi dose-dependente da concentração da fração diclorometano (L).

- As plântulas que se mostraram mais sensíveis em relação ao crescimento de parte aérea e radicular foram as de cebola e tomate.

- A fração 75-100 se apresentou cristalizada e mais purificada, e nela foram obtidos seis produtos que se encontram em fase de identificação na Universidade de Cádiz (UCA, Espanha).

- Em outras frações com atividade alelopática foram identificadas substâncias pertencentes ao grupo dos esteróis e das lignanas, sendo uma delas a fargesina. Estes seriam os compostos majoritários presentes nas raízes de *Aristolochia esperanzae*, possivelmente responsáveis pela atividade alelopática encontrada nesta espécie.

APÊNDICE

Na figura I está apresentado resumidamente a biossíntese dos principais metabólitos secundários, e na tabela I está apresentado uma série de solventes, em ordem crescente de polaridade.

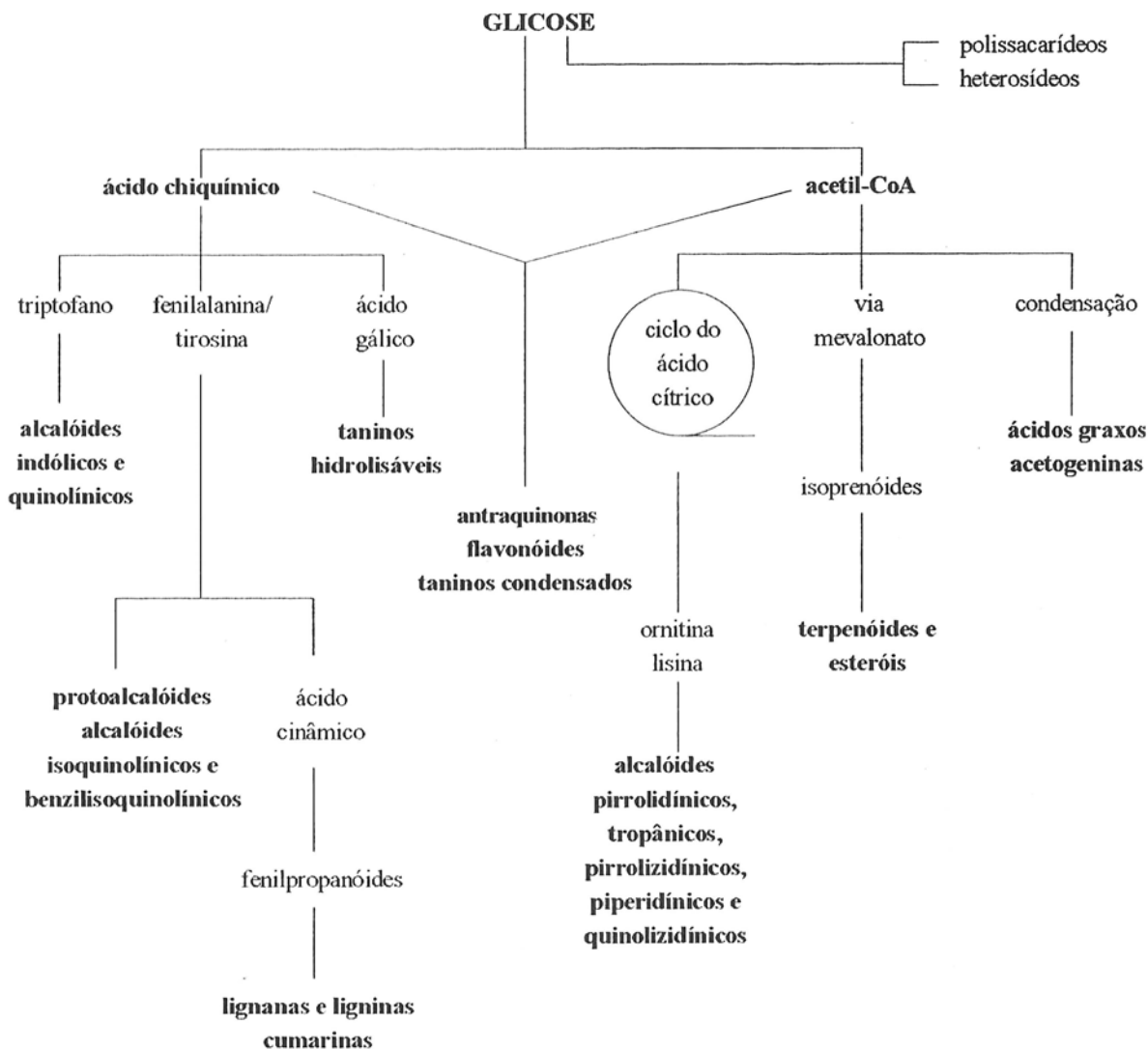


Figura I - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Simões *et al.*, 2003).

Tabela I - Série gradual de eluentes. (Fonte: Collins, *et al.*,1990).

Série de eluentes, em ordem crescente de polaridade *

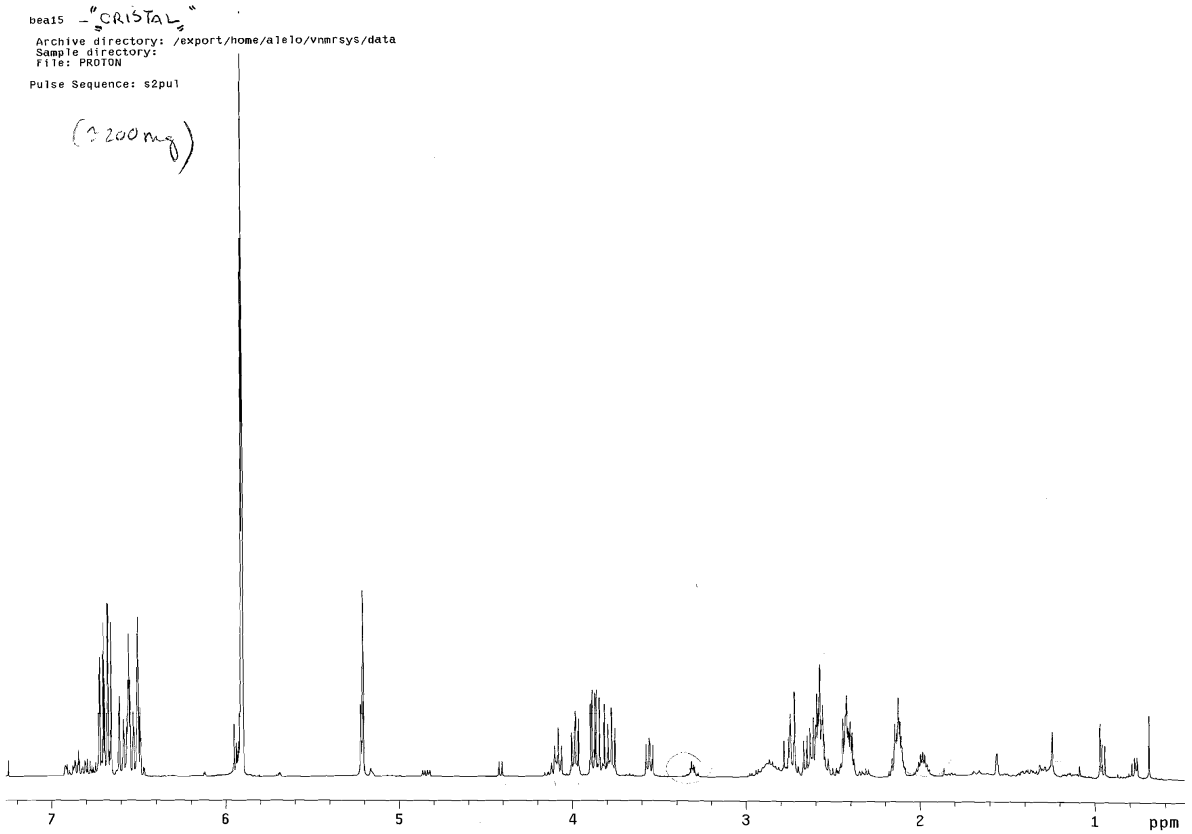
Hexano
Éter de Petróleo
Ciclohexano
Tetracloroeto de Carbono
Benzeno
Tolueno
Diclorometano
Clorofórmio
Éter Etilico
Acetato de Etila
Piridina
Acetona
Etanol
Metanol
Ácido Acético

* de ponto de ebulição baixo

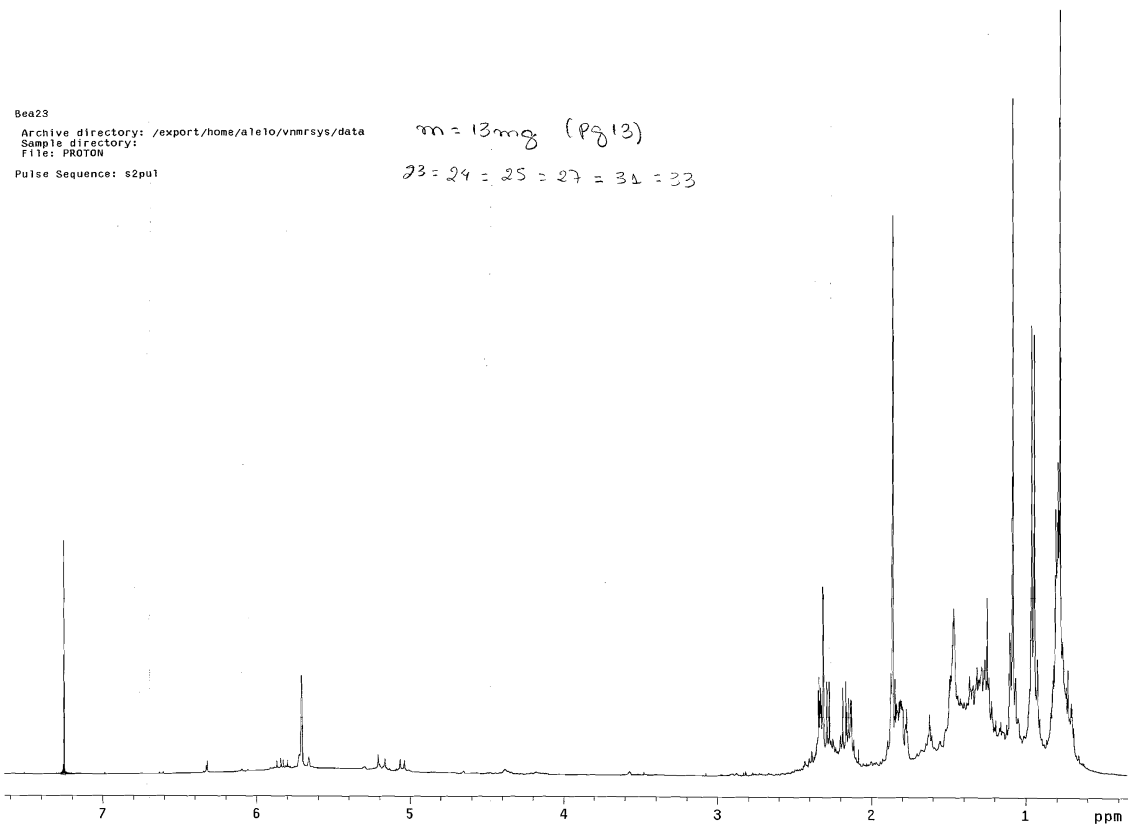
COLLINS, C.H. (1990). Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, Editora da UNICAMP. p. 11-28.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (2003). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS 1102p.

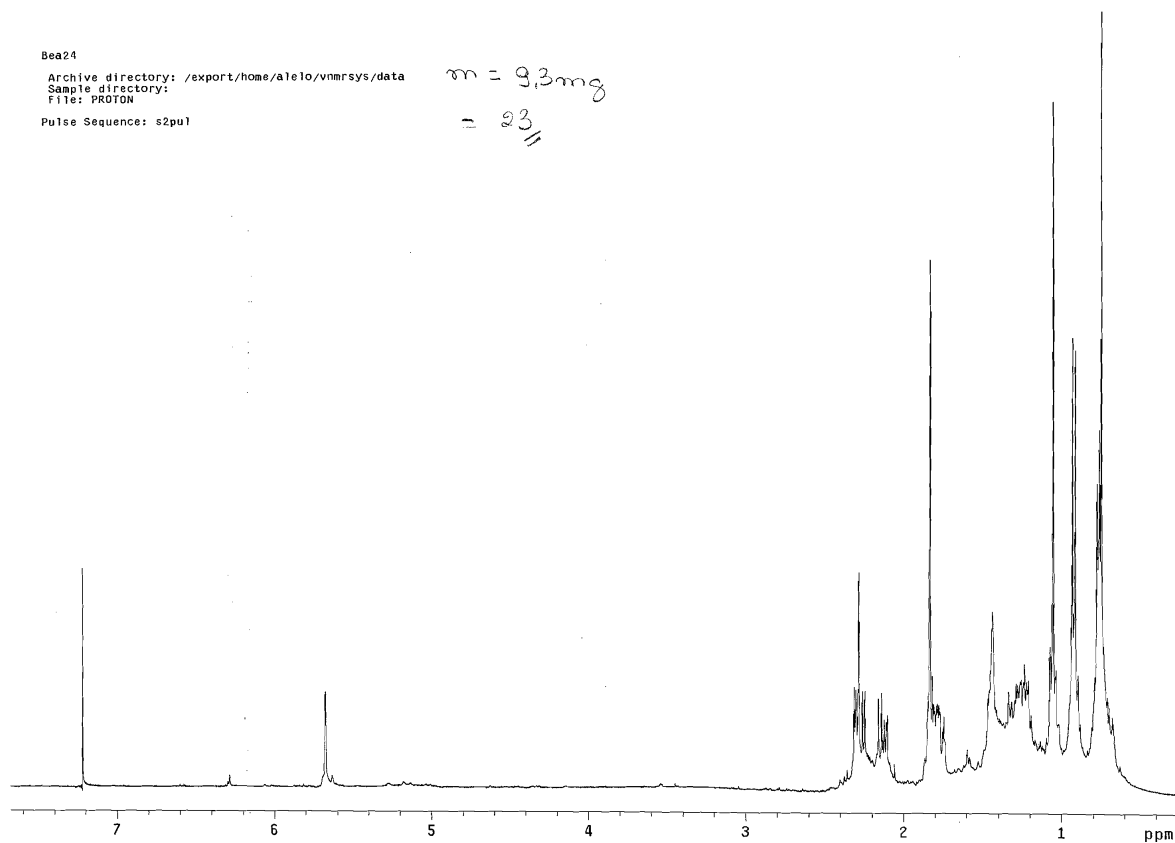
ANEXO - ESPECTRO DE RMN-H¹



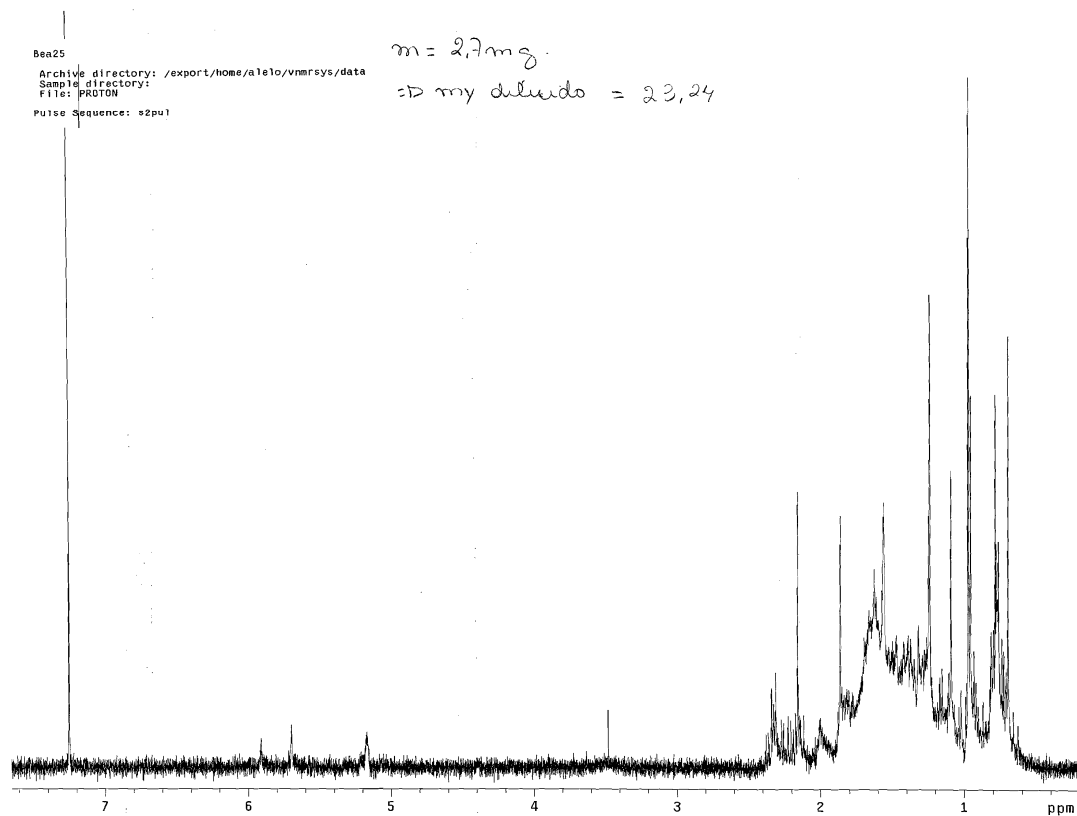
Espectro de RMN-H¹ da fração 75-100.



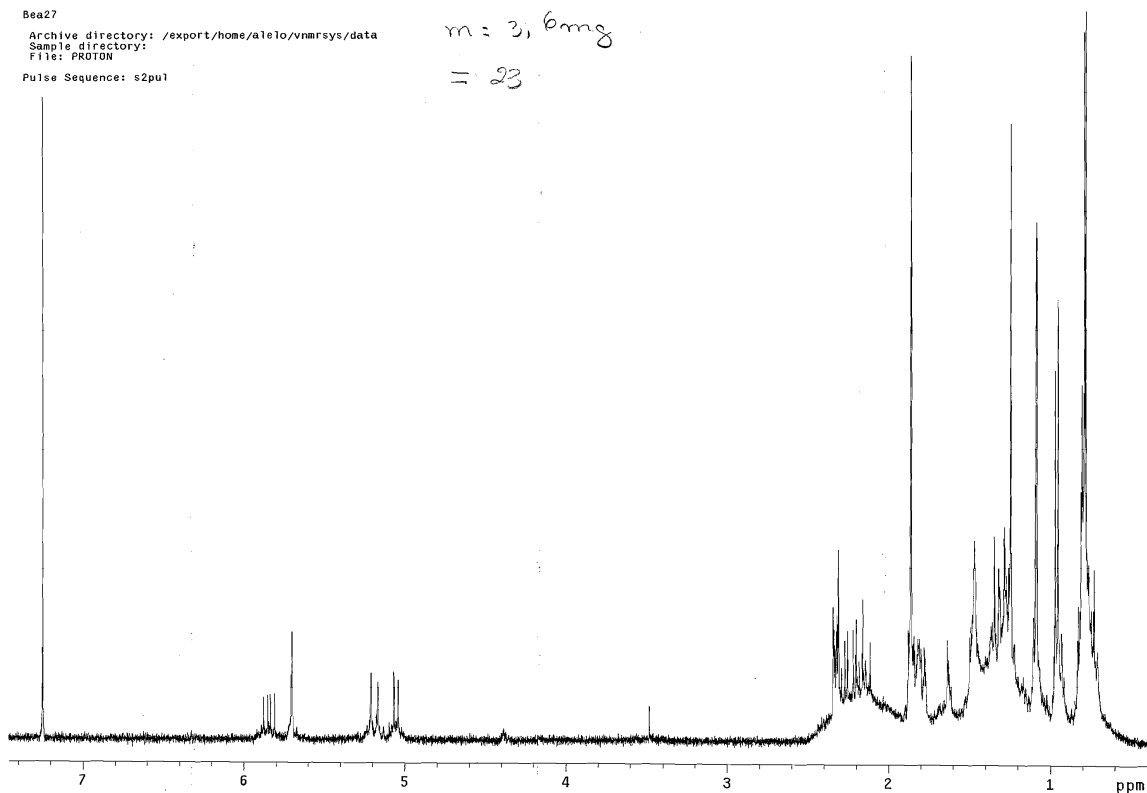
Espectro de RMN-H¹ da fração 23.



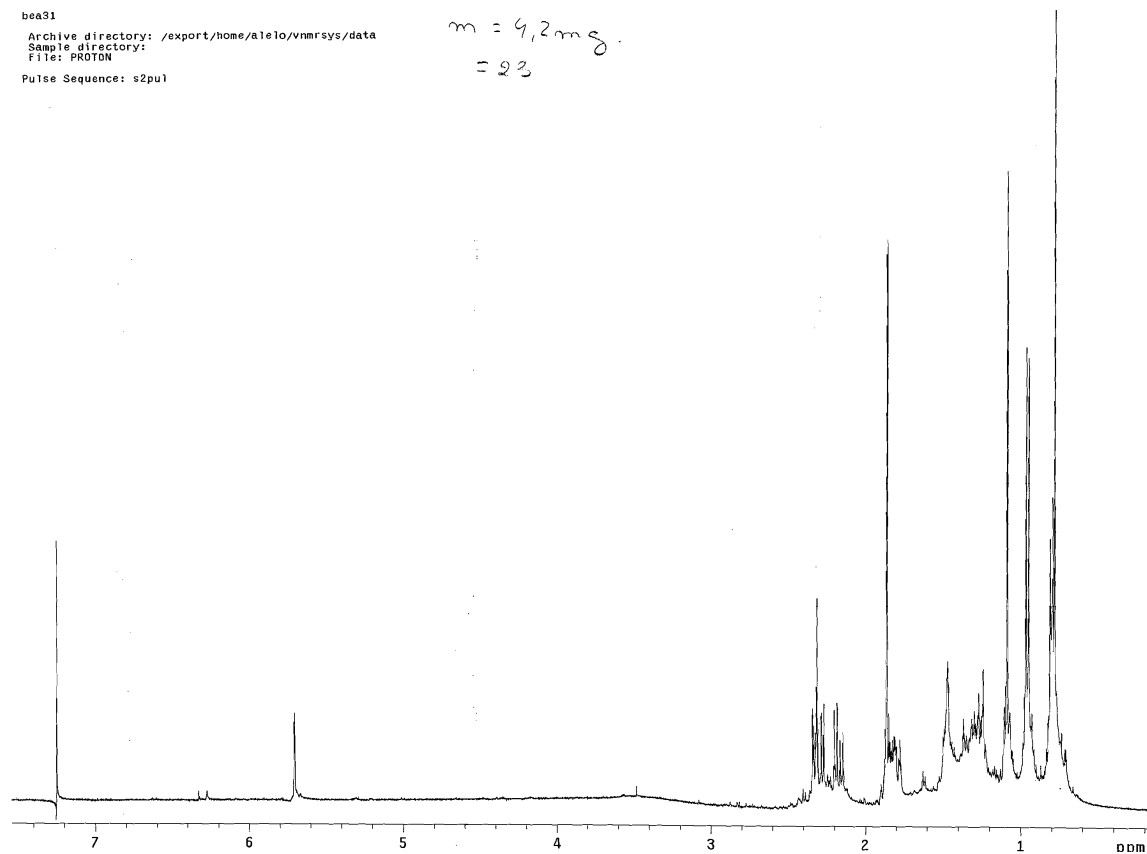
Espectro de RMN-H¹ da fração 24.



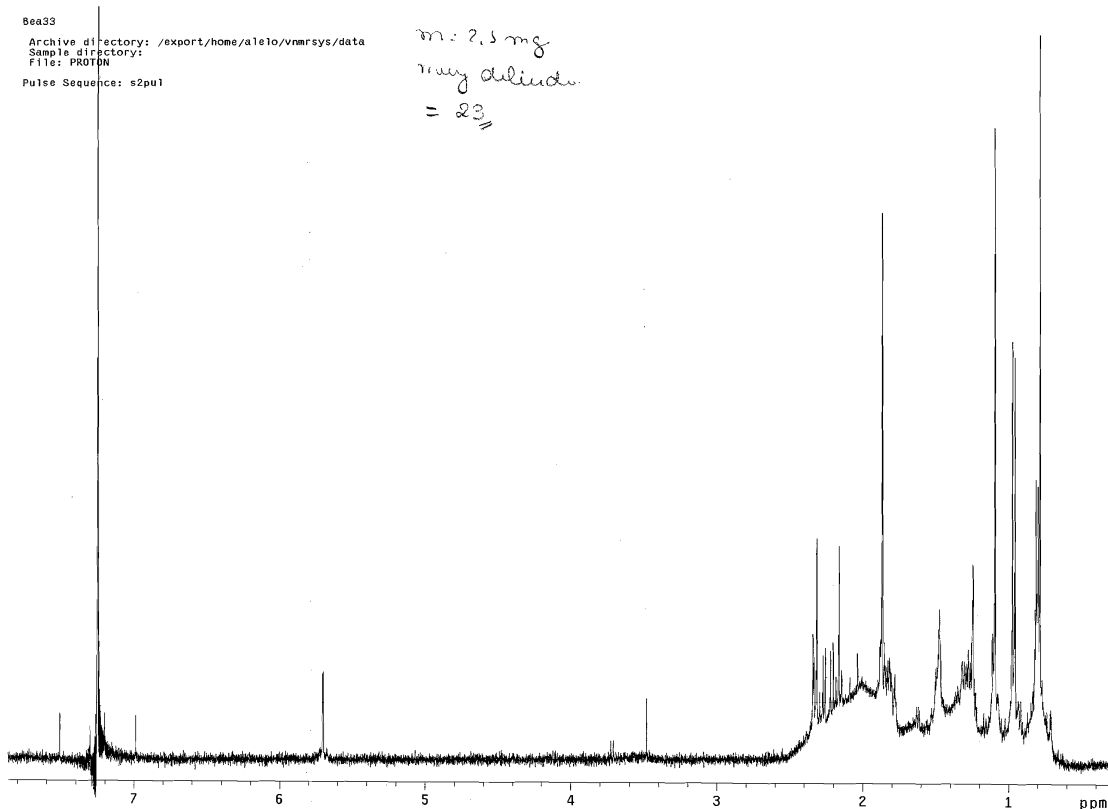
Espectro de RMN-H¹ da fração 25.



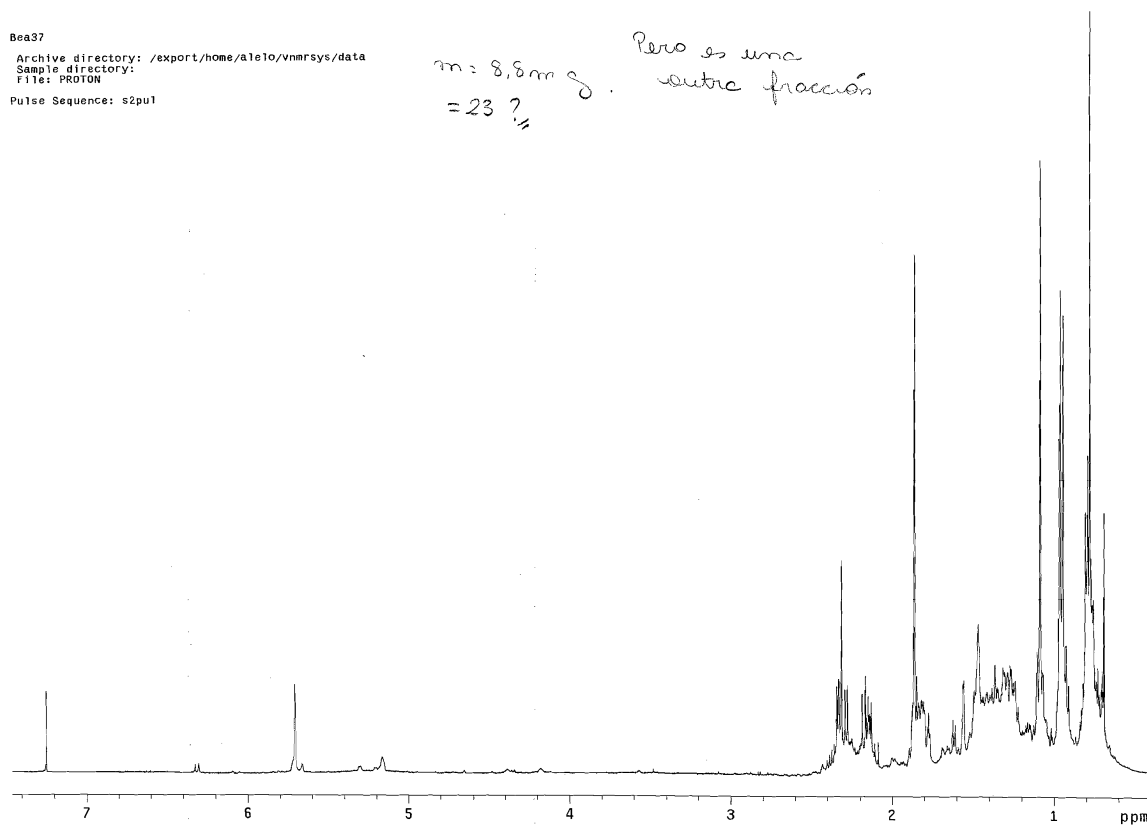
Espectro de RMN-H¹ da fração 27.



Espectro de RMN-H¹ da fração 31.



Espectro de RMN-H¹ da fração 33.

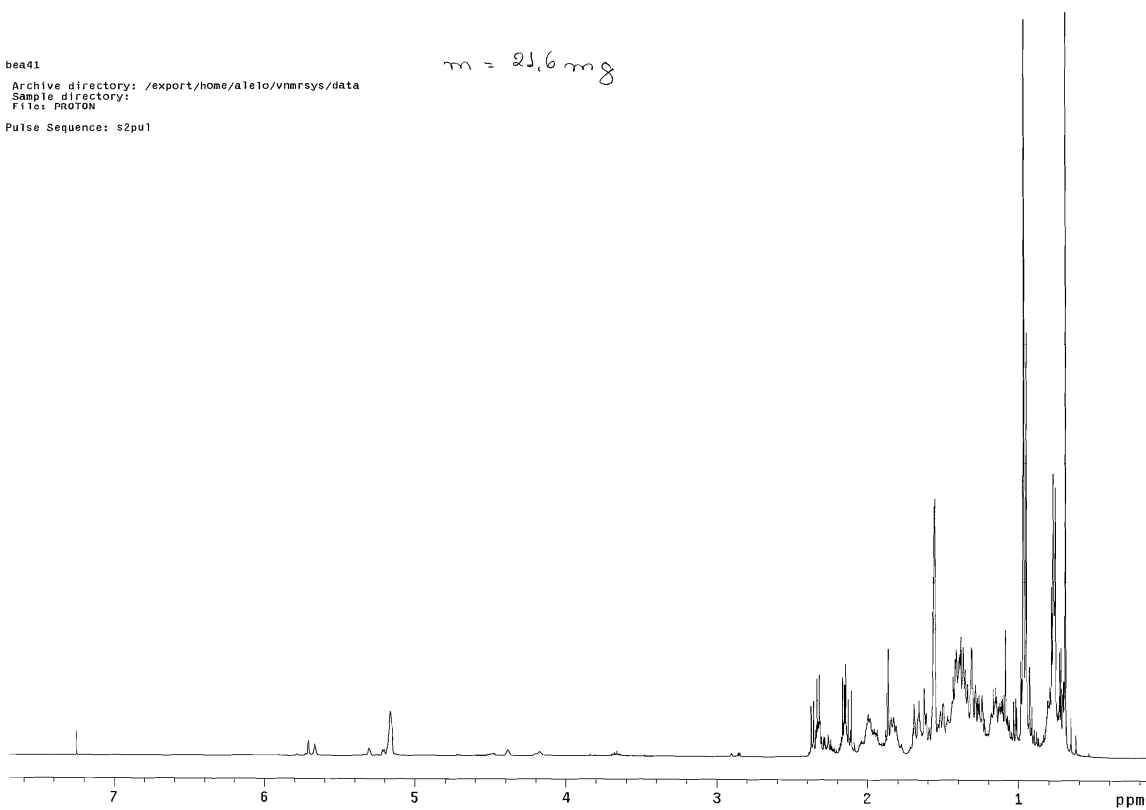


Espectro de RMN-H¹ da fração 37.

bea41

Archive directory: /export/home/alelo/vnmrsys/data
Sample directory:
File: PROTON

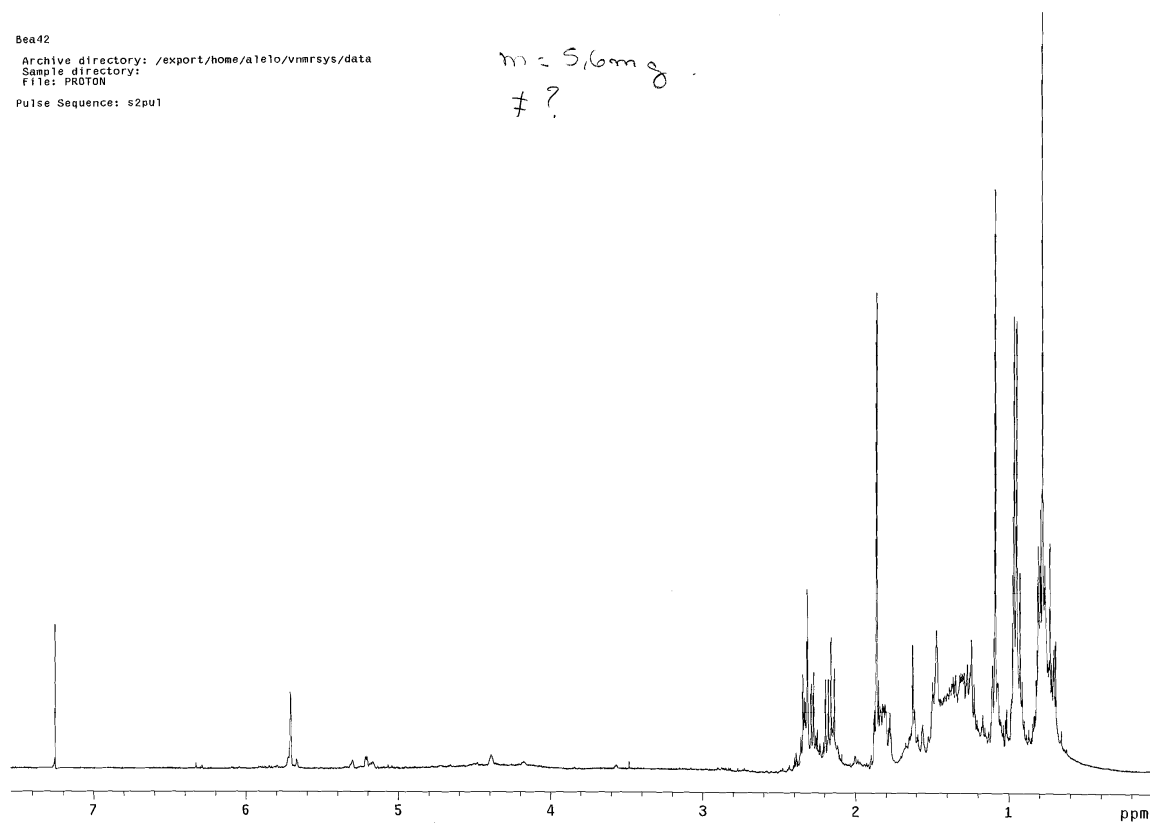
Pulse Sequence: s2pu1

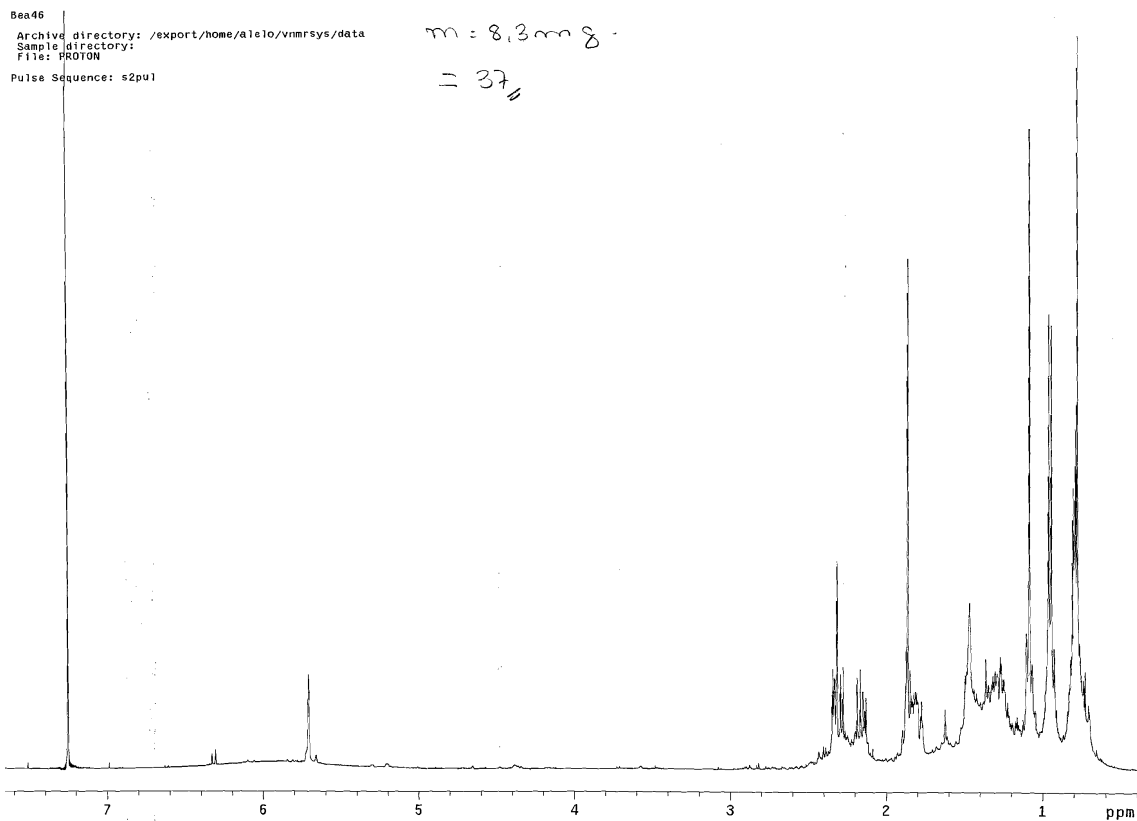
 $m = 21,6 \text{ mg}$ Espectro de RMN-H¹ da fração 41.

Bea42

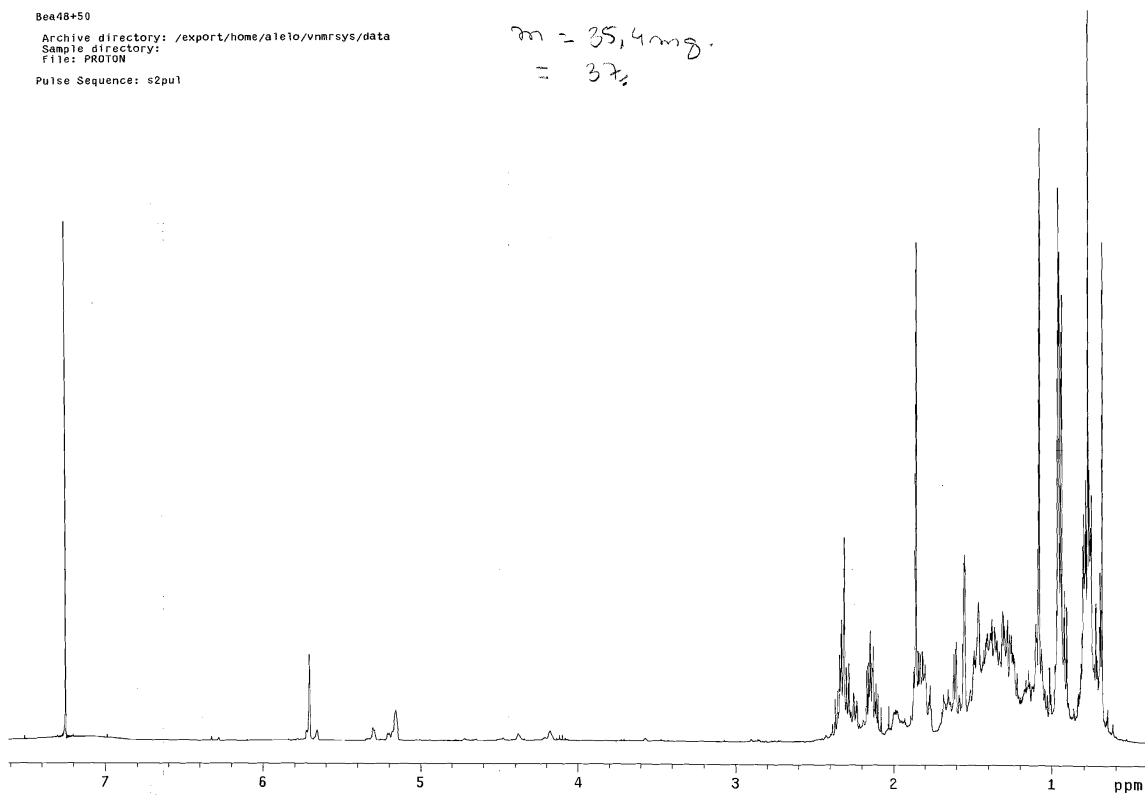
Archive directory: /export/home/alelo/vnmrsys/data
Sample directory:
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1

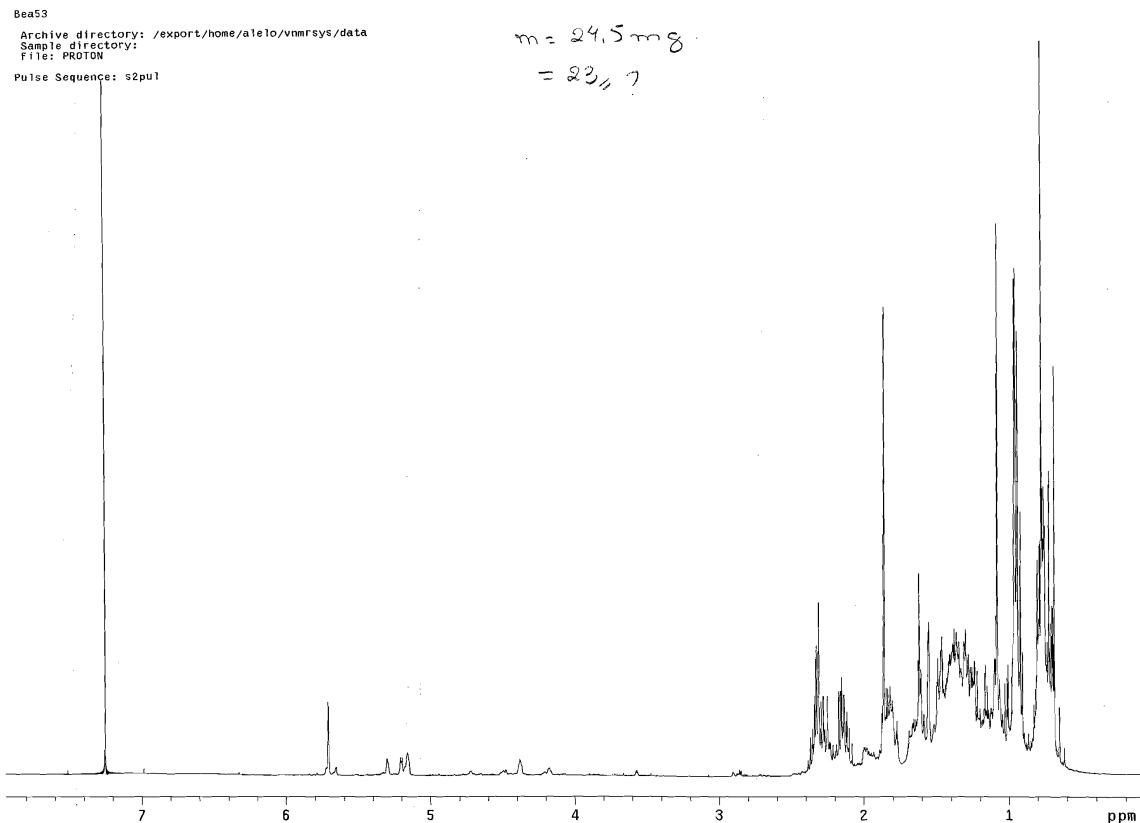
 $m = 5,6 \text{ mg}$
≠ ?Espectro de RMN-H¹ da fração 42.



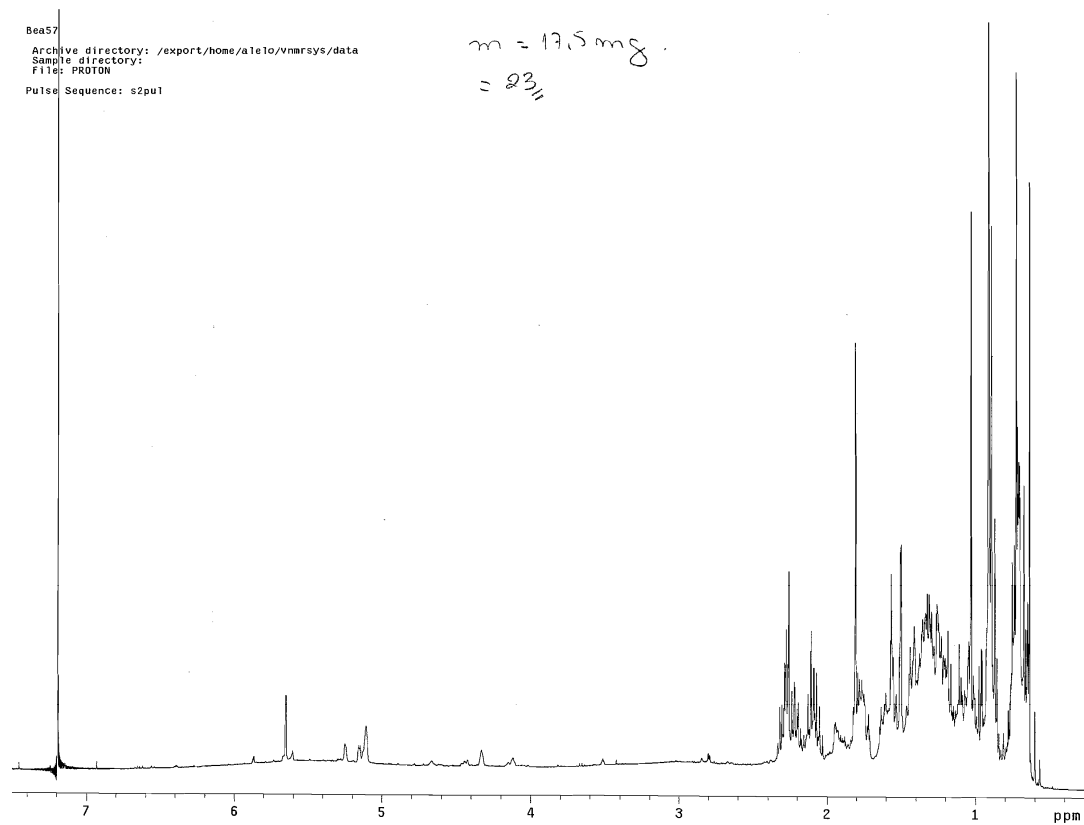
Espectro de RMN-H¹ da fração 46.



Espectro de RMN-H¹ da fração 48 reunida com a fração 50.



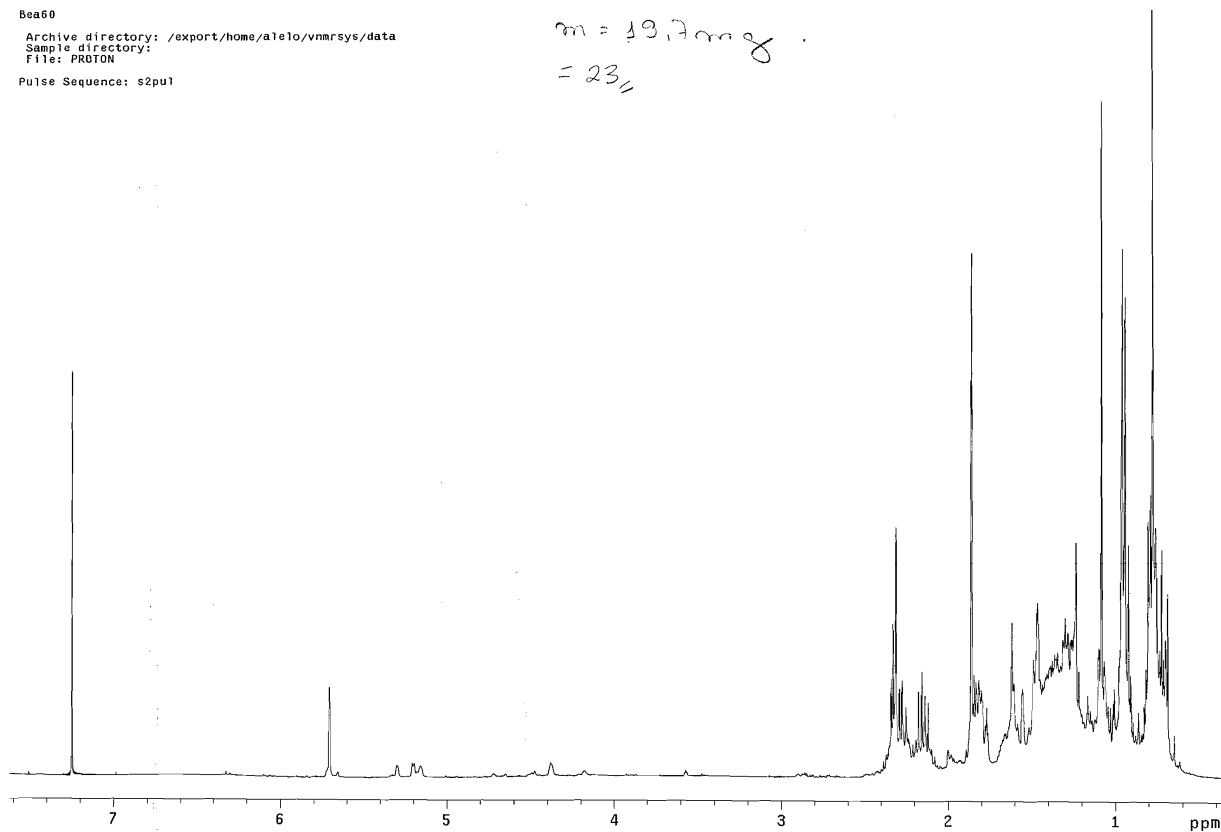
Espectro de RMN-H¹ da fração 53.



Espectro de RMN-H¹ da fração 57.

Bea60
 Archive directory: /export/home/alelo/vnmrsys/data
 Sample directory:
 File: PROTON
 Pulse Sequence: s2pu1

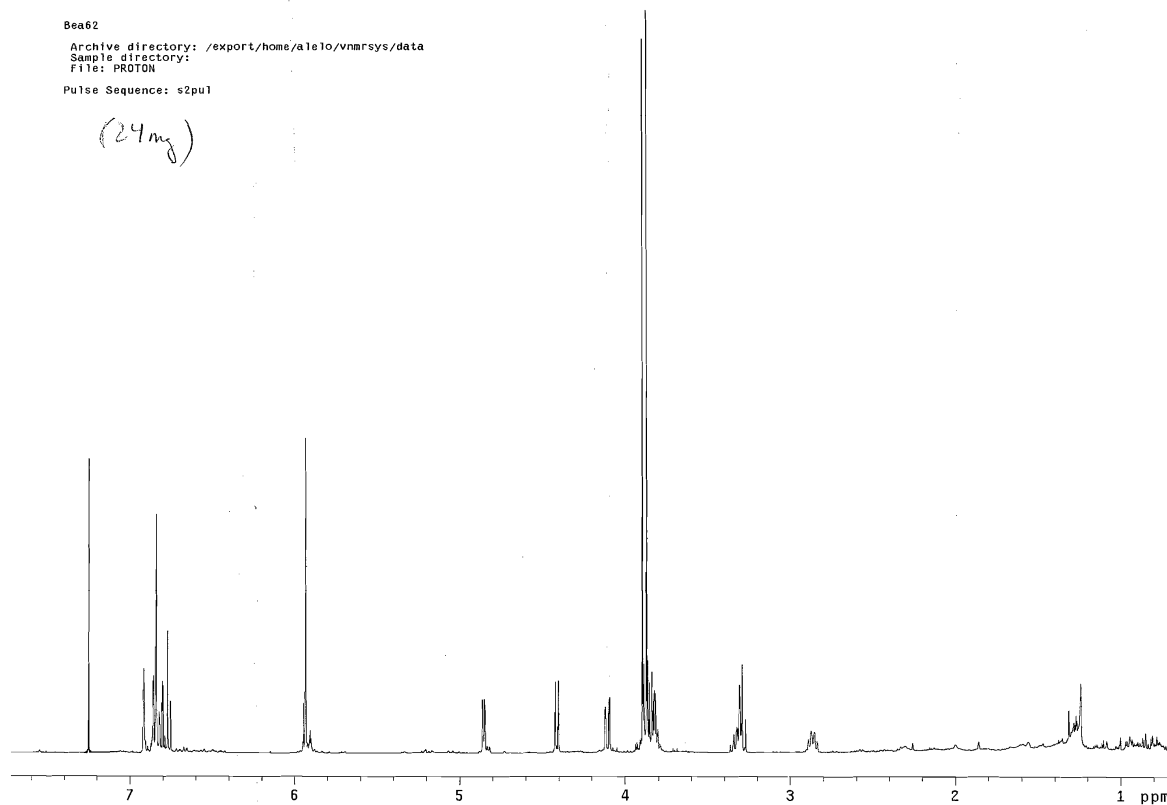
m = 19,7 mg
= 23''



Espectro de RMN-H¹ da fração 60.

Bea62
 Archive directory: /export/home/alelo/vnmrsys/data
 Sample directory:
 File: PROTON
 Pulse Sequence: s2pu1

(24 mg)



Espectro de RMN-H¹ da fração 62.