

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

Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de
Rapanea umbellata

Paula Novaes

São Carlos
11 de Julho de 2011

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

Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de
Rapanea umbellata

Ms. Paula Novaes

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Cristina J. Gualtieri

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação de Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos
11 de Julho de 2011

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

N935ab

Novaes, Paula.

Alelopatia e bioprospecção em *Rapanea ferruginea* e
Rapanea umbellata / Paula Novaes. -- São Carlos : UFSCar,
2011.

112f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Alelopatia. 2. Fitoquímica. 3. Herbicida. 4. Metabolitos
secundários. 5. Cerrado. I. Título.

CDD: 581.23 (20^a)

Paula Novaes

Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata*

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

Aprovada em 11 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Profa. Dra. Sonia Cristina J. Gualtieri
(Orientadora)

1º Examinador



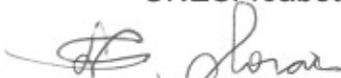
Profa. Dra. Andreia Pereira Matos
UNICEP/São Carlos-SP

2º Examinador



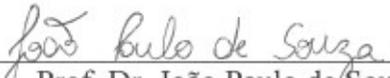
Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Alves
UNESP/Jaboticabal-SP

3º Examinador



Profa. Dra. Lilia Aparecida Salgado de Moraes
EMBRAPA/Jaguariúna-SP

4º Examinador



Prof. Dr. João Paulo de Souza
UFV/Florestal-MG

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente à:

Minha orientadora, Professora Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, por me aceitar como aluna, me orientar, ensinar e corrigir meus trabalhos. Agradeço também pela sua amizade, simpatia, carinho, e por ter sido muito solícita sempre.

Minha co-orientadora, Professora Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, pelas muitas idéias, colaboração nos trabalhos, correção dos manuscritos e por ter sido sempre uma amiga no Departamento de Botânica.

Minha companheira de trabalho e amiga, Dra. Maristela Imatomi, pela ajuda em campo, em laboratório no Brasil e na Espanha, pelas correções, risadas e conversas que tornaram o doutorado muito mais divertido.

Professores do Grupo de Alelopatia de Cádiz, Dr. Francisco Antonio Macías, Dr. José M.G. Molinillo (Chema) e Dra. Rosa Maria Varella por terem me acolhido tão bem e terem me ensinado e ajudado muito. Agradeço também ao técnico Blás Del Valle, por toda a ajuda em laboratório e conversas agradáveis, e aos alunos que me ajudaram e tornaram meu estágio na Espanha uma experiência única: Maristela Imatomi, Sarah e Carlos Oliveira, Mariluce Nepomuceno, Silmara Fanti, Andy Pérez de Armas e Rodney Lacret.

Biotecnólogo Carlos Casali pela amizade e apoio nas atividades no Laboratório de Ecofisiologia de Sementes.

Dr. Luis Carlos Bernacci, pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), por ter gentilmente identificado as espécies de *Rapanea*.

Professores que compuseram a banca de defesa, Dra. Andréia Pereira Matos, Dra. Lilia A. Salgado de Moraes, Dra. Sonia C. J. Gualtieri, Dr. João Paulo de Souza e Dr. Pedro Luis da Costa Alves, pelas sugestões e correções que enriqueceram a tese.

Professores que compuseram a banca de qualificação, Dra. Alessandra Penha, Dra. Eliana Simabukuro e Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, pelas sugestões que contribuíram ao desenvolvimento do trabalho.

Sr. Ademir, pela ajuda nas coletas em campo.

Colegas de grupo de pesquisa e de laboratório: Luciana Jatobá, Maria Augusta Machado, Patricia Umeda, Simone Anese, Fernando Campanesi, Leandro Takao, Reginaldo Sadao Matsumoto, Silmara Fanti, Valquíria Voltarelli e especialmente, Ana Beatriz Gatti e Luiza Moraes, por me receberem tão bem no laboratório, terem me ensinado e ajudado muito.

Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos e seus funcionários.

Minha mãe, Regina, pelo exemplo, conselhos, carinho e paciência.

Meu pai, Celso, pelo exemplo de vida, apoio e pelas oportunidades de escolha que me proporcionou.

Meu irmão Marcel, por todos os conselhos, ajudas e abraços gostosos e ao meu irmão Ricardo pela sua sempre carinhosa amizade. Meus sobrinhos queridos Mateus e Julia, pelo sorriso sincero.

Meu namorado Rodrigo, pelo amor, carinho, atenção, respeito, companheirismo e principalmente pela paciência. Com a sua companhia, tudo fica mais fácil.

Amigos Sandra, Alessandra, Gau, Guto, Tati Corrêa e Tati Terasin, João Pedro, Nando, Bruno, Guta, Carol, Melissa, Fabiana, Daniel, João Paulo, Marcos, Rodrigo Alves, Maíra Pombo, Maíra Nunes, Amanda, Leonardo, Graziela, Marília e Marcelo.

Em memória de minhas duas avós, que faleceram durante este doutorado: Amélia, sempre tão carinhosa, e Maria, que me ensinou a amar as plantas.

Esse trabalho teve apoio do CNPq (bolsas de doutorado) e da CAPES (suporte financeiro).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	viii
SUMÁRIO DE TABELAS.....	xi
RESUMO GERAL.....	01
ABSTRACT.....	02
INTRODUÇÃO GERAL.....	03
Biodiversidade e o Cerrado.....	03
Agricultura.....	05
Metabólitos secundários.....	06
Alelopatia.....	09
Isolamento e purificação de produtos naturais.....	12
As espécies escolhidas.....	13
Hipóteses e objetivos.....	15
Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 1: Influência do estágio de desenvolvimento e da sazonalidade no potencial alelopático de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez e <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae).....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	24
Introdução.....	24
Material e métodos.....	26
Resultados.....	31
Discussão.....	46
Referências bibliográficas.....	48
CAPÍTULO 2: Efeitos alelopáticos de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) sobre plantas infestantes de culturas agrícolas.....	51
Resumo.....	52
Abstract.....	52
Introdução.....	53

Material e métodos.....	55
Resultados e discussão.....	58
Conclusões.....	67
Referências bibliográficas.....	68
CAPÍTULO 3: Atividade alelopática de frações contendo (-)-catechin e luteína em extrato acetônico de folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae).....	73
Resumo.....	74
Abstract.....	74
Introdução.....	75
Material e métodos.....	77
Resultados e discussão.....	82
Conclusões.....	100
Referências bibliográficas.....	101
CONCLUSÃO GERAL.....	107
ANEXOS.....	108

SUMÁRIO DE FIGURAS

FIGURA I.1 - <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez.....	13
FIGURA I.2 - <i>Rapanea umbellata</i> Mart (Primulaceae).....	14
FIGURA 1.1 - Valores médios mensais das temperaturas (símbolos) máxima (T_{max}), média (T_{med}) e mínima (T_{min}), e precipitação total mensal (colunas) de novembro de 2007 a julho de 2008. As coletas das folhas foram realizadas em fevereiro e julho de 2008 (indicadas pelas setas).....	28
FIGURA 1.2 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de porcentagem de germinação e tempo médio de germinação de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca em concentração 10%.....	33
FIGURA 1.3 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de porcentagem de germinação e tempo médio de germinação de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez. (R. fer) e <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca em concentração 5%.....	35
FIGURA 1.4 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) da entropia informacional de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez. (R. fer) e <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca nas concentrações 10 e 5%	37
FIGURA 1.5 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de comprimento (mm) das partes aérea (PA) e radicular (PR) de plântulas de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou aos extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez. (R fer) e <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca nas concentrações de 10 e 5%.....	39

FIGURA 1.6 – Análise dos componentes principais (APC) que determinam a atividade de extratos foliar aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre diásporos de alface. Os vetores representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional (E) de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de alface sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05).....41

FIGURA 1.7 – Análise dos componentes principais que determinam a atividade de extratos foliar aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre diásporos de cebola. São apresentados vetores que representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de cebola sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05).....42

FIGURA 1.8 – Análise dos componentes principais que determinam a atividade de extratos foliar aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre sementes de tomate. São apresentados vetores que representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de tomate sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05).....43

FIGURA 2.1 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de porcentagem e tempo médio de germinação de sementes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%.....59

FIGURA 2.2 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de entropia informacional de germinação e tempo médio de germinação de sementes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos

foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%.....61

FIGURA 2.3 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de comprimento inicial (mm) das partes aérea (PA) e radicular (PR) de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%.....64

FIGURA 2.4 – Anomalias observadas na parte radicular de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle) e extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) nas concentrações de 10 e 5%.....66

FIGURA 3.1 – Esquema que resume os procedimentos de fracionamento, os extratos, as frações e as sub-frações para a purificação de luteína e (-)-Catequina das folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez.....78

FIGURA 3.2 – Comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L., Poaceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....83

FIGURA 3.3 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de sementes de agrião (*Lepidium sativum* L., Cruciferaeae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....85

FIGURA 3.4 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L., Asteraceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....87

FIGURA 3.5 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) em água destilada (controle), nos extratos de

folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....	89
FIGURA 3.6 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de sementes de cebola (<i>Allium cepa</i> L., Liliaceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....	91
FIGURA 3.7 - Comprimento de coleótilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L., Poaceae) em água destilada (controle), nas frações E, G e H do extrato de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) em acetona e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm.....	93
FIGURA 3.8 – Composto isolado da sub-fração E3 do extrato acetônico de folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez.....	95
FIGURA 3.9 – Composto isolado da sub-fração H5 do extrato acetônico de folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez.....	97
FIGURA 4.1 – Espectro de ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) do composto luteína.....	109
FIGURA 4.2 – Espectro de ¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃) do composto luteína.....	110
FIGURA 4.6 – Espectros de ¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD) do composto (-)-Catequina.....	111
FIGURA 4.7 – Espectros de ¹³ C-NMR (100 MHz, CD ₃ OD) do composto (-)-Catequina.....	112

SUMÁRIO DE TABELAS

TABELA 1.1 - Potenciais osmóticos (PO, bar) e potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez e <i>Rapanea umbellata</i> Mart. (Primulaceae) provenientes de estações chuvosa ou seca nas concentrações de 10 e 5%.....	32
TABELA 1.2 – Ordem decrescente no total de frequência de atividade alelopática dos extratos foliar aquosos de indivíduos adultos ou jovens de <i>Rapanea ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) Mez. e	

<i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) provenientes de estação chuvosa e seca, nas concentrações de 10 e 5%.....	45
TABELA 3.1 – Massas e rendimentos dos extratos de 10 g folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) em solventes orgânicos.....	82
TABELA 3.2 - Massa e rendimento das frações do extrato foliar de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez (Primulaceae) em acetona.....	92
TABELA 3.3 - Concentração calculada de luteína e (-)-Catequina nas soluções contendo o extrato acetônico de folhas de <i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez e nas suas frações E e H.....	96

RESUMO GERAL

Alelopatia é o processo que envolve metabólitos secundários ou primários, produzidos pelas plantas e microrganismos, que influencia o crescimento e o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos. A intensidade dos efeitos alelopáticos de uma planta pode depender do hábitat, da idade e condições bióticas e abióticas a que estavam sujeitas na época em que forem coletadas. Quando substâncias alelopáticas são purificadas e identificadas, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de produtos alternativos baseados em compostos naturais para o controle de espécies infestantes. O ambiente de cerrado possui condições ambientais bastante estressantes, principalmente na época da seca, e deve favorecer uma maior variedade de aleloquímicos nas espécies *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae), que possuem folhas com canais resiníferos e glândulas secretoras diminutas, esparsas por toda face abaxial, que podem acumular terpenos ou taninos. A hipótese desta tese é que devem existir substâncias alelopáticas em espécies de *Rapanea* que favoreçam o seu estabelecimento no cerrado e que estas devem ser influenciadas por fatores sazonais ou pela idade das plantas. A alelopatia ocorre pela liberação de aleloquímicos no ambiente e estes podem apresentar importância econômica, servindo de modelos para a produção de herbicidas de origem natural, menos agressivos ao meio ambiente. No primeiro capítulo, comparou-se o efeito da idade e da sazonalidade da época de coleta das folhas sobre a atividade alelopática de extratos aquosos de indivíduos de *R. ferruginea* e *R. umbellata*. Para tanto, bioensaios de germinação e comprimento inicial de espécies bioindicadoras cultivadas comercialmente (alface, tomate e cebola) foram realizados sob influência dos extratos foliares aquosos de indivíduos adultos e jovens provenientes de estação chuvosa e seca à 10 e 5% (massa de pó de folhas por volume de água destilada, g/mL). O extrato de *R. umbellata* adulta coletada em estação seca apresentou atividade alelopática elevada e foi escolhido para os demais estudos desta tese. No segundo capítulo, comparou-se a atividade alelopática do extrato aquoso foliar de *R. umbellata* (10 e 5%) com a de um herbicida sintético (oxifluorfem) sobre a germinação e comprimento inicial de espécies infestantes de culturas agrícolas: capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae). No terceiro capítulo, a bioprospecção, purificação e isolamento de metabólitos secundários de interesse agrônomo foi realizada com folhas de *R. umbellata*. Para que houvesse um direcionamento na purificação destes compostos, bioensaios de coleóptilos estiolados de trigo, germinação e comprimento inicial de agrião, alface, cebola e tomate foram realizados sob efeito de extratos de solventes orgânicos. O extrato acetônico foi o mais ativo e, portanto, foi utilizado em fracionamento em coluna cromatográfica. Suas frações foram purificadas em CLAE e coluna de Sephadex. Os compostos isolados e purificados foram identificados através de RMN¹H e ¹³C. Os resultados obtidos com esta tese permitem dizer que a alelopatia é uma das formas das espécies de *R. ferruginea* e *R. umbellata* se estabelecerem no cerrado. A atividade alelopática de suas folhas é influenciada em maior grau pela época de coleta (mais ativas em estação seca) do que pela idade das plantas. O extrato foliar aquoso de *R. umbellata* apresentou ação distinta do herbicida sintético oxifluorfem, sendo bastante ativo sobre a parte radicular das espécies infestantes, enquanto o herbicida sintético foi mais ativo sobre a parte aérea destas espécies. A bioprospecção das folhas de *R. umbellata* levou ao isolamento e a purificação das substâncias luteína e (-)-Catequina. A (-)-Catequina apresenta potencial para ser utilizada como herbicida de origem natural e biodegradável.

Palavras-chave: Aleloquímicos, Fitoquímica, Herbicida, Metabólitos Secundários, Savana.

ABSTRACT

Allelopathy is a process that involves primary or secondary metabolites produced by plants and microorganisms, which influences the growth and development of agricultural and biological systems. The intensity of plant allelopathic effects may depend on the hábitat, age and the biotic and abiotic conditions during the seasons in which they were collected. When allelopathic substances are purified and identified, they can be used to develop alternative products based on natural compounds to control weed species. The Brazilian savanna (cerrado) has very stressful environment conditions, mainly in dry periods, and should favor a greater variety of allelochemicals in *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez and *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae), which have leaves with resin canals and minute secretory glands, sparse throughout the abaxial surface, that can accumulate terpenes or tannins. This thesis hypothesis is that there must be allelopathic substances in the species of *Rapanea* to favor their establishment in the savanna and that they should be influenced by seasonal factors or by plant age. Allelopathy occurs by the release of allelochemicals in the environment and these may have economic importance, serving as molecular models for the production of natural herbicides, less harmful to the environment. In the first chapter, we compared the effect of plant age and season of leave collection on the allelopathic activity of aqueous extracts of *R. ferruginea* and *R. umbellata*. For this, germination and initial length bioassays were conducted using commercially bioindicator cultivated species (lettuce, tomato and onion) under the influence of the aqueous leaf extracts of adults and young individuals from wet and dry season at 10 and 5% (weight of leaf powder per volume of distilled water, g/mL). The extract of adult *R. umbellata* collected in the dry season showed the highest allelopathic activity and was chosen for the other studies of this thesis. In the second chapter, we compared the allelopathic activity of leaf aqueous extract of *R. umbellata* (10 and 5%) with the synthetic herbicide Oxyfluorfen on germination and initial length of weed species: barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae), wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae) and morning-glory (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae). In the third chapter, bioprospection, purification and isolation of secondary metabolites of agronomic interest was performed with *R. umbellata* leaves. Bioassays wheat of etiolated coleoptiles and germination and initial length of cress, lettuce, onion and tomato were performed under the effect of extracts of organic solvents for the direction of the compounds purification. The acetone extract was the most active and therefore was used to be fractionated by chromatographic column. Its fractions were purified HPLC and Sephadex column. The isolated and purified compounds were identified by NMR¹H and ¹³C spectra. This thesis results permit us to affirm that allelopathy is one way of the *R. ferruginea* and *R. umbellata* species to establish themselves in the savanna. The allelopathic activity of its leaves is influenced to a greater degree by the collection season (most active in dry season) than by plant age. The *R. umbellata* aqueous leaf extract showed distinct action than the Oxyfluorfen synthetic herbicide, being very active on the root part of the weed species while the synthetic herbicide was more active on the arial parts of these species. The bioprospection of *R. umbellata* leaves conditioned isolation and purification of the substances lutein and (-)-catechin. (-)-Catechin has the potential to be used as a natural origin and biodegradable herbicide.

Key-words: Allelochemicals, Herbicide, Phytochemistry Secondary Metabolites, Savanna.

INTRODUÇÃO GERAL:

Biodiversidade e o Cerrado

A biodiversidade na Terra se divide em três níveis, que interagem entre si (Odum & Barrett 2011): a diversidade de habitats, a diversidade de espécies e a diversidade genética. Ela pode apresentar valor econômico direto ou indireto. Entre os diversos tipos de uso da biodiversidade com valor econômico direto, estão o consumo de variedades de espécies alimentícias e outros materiais para subsistência da população humana, além de produtos madeireiros e não-madeireiros extraídos do ambiente natural e negociados em mercados nacionais e internacionais. Além disso, esta categoria inclui o valor potencial de novos produtos para a indústria, farmácia, agricultura e o melhoramento genético de espécies agrícolas (Mota 2003). Por exemplo, uma espécie selvagem pode apresentar genes que confirmam maior produtividade ou maior resistência a patógenos, ou pode conter ingredientes desconhecidos que levem a novas drogas medicamentosas, herbicidas e pesticidas de origem natural.

Entre os usos da biodiversidade com valor econômico indireto estão os serviços ambientais que os ecossistemas apresentam como controle de erosão, abastecimento de água, controle da poluição atmosférica, polinização, berçários para peixes e recreação (Bernardes 1999). Exceto pelo abastecimento de água, estes serviços, normalmente, não são cobrados pelos governos dos países, mas caso falem trarão grandes prejuízos e até colapsos dos sistemas urbanos.

Apesar do valor que a biodiversidade apresenta à humanidade, ela vem sendo perdida de várias maneiras. O homem sempre exerceu pressão modificadora sobre a natureza, mas ela se intensificou após a revolução industrial no século XVIII. Atualmente as taxas de extinção alcançaram valores sem precedentes no período geológico em que vivemos (May 2010; Primack & Rodrigues 2001). A extinção de espécies normalmente não ocorre por um único fator. Na maioria dos casos, várias forças diferentes agem sinergicamente. Os fatores que afetam a biodiversidade são (do mais ao menos impactante): o desmatamento e a fragmentação dos habitats, invasões de espécies exógenas, poluição ambiental, pressão antrópica das superpopulações humanas e caça indiscriminada (Wilson 2002).

O desmatamento, seja por retirada de madeira, queimadas, urbanização ou expansão da fronteira agrícola, reduz diretamente a biodiversidade. Quando ele não acaba totalmente com os habitats, cria fragmentos com ilhas de vegetação remanescente com maiores

quantidades de borda. Alguns efeitos de borda mais importantes são as alterações da luminosidade, temperatura, umidade e vento que podem alterar drasticamente a composição biológica da área (Odum & Barrett 2011). A diversidade de árvores, por exemplo, deverá diminuir na borda em relação ao centro da formação florestal. Além disso, o excesso de borda facilita a entrada de espécies exóticas no ambiente (Carmo *et al.* 2011). A redução das áreas de habitats por desmatamento resulta em ilhas capazes de tolerar apenas um número limitado de espécies. Se o tamanho das populações for pequeno demais, haverá depressão endogâmica que levará a extinções (Simberloff 1986).

O Cerrado é uma das formações vegetais de grande biodiversidade encontrada no Brasil com maior pressão de perda de biodiversidade por desmatamento e fragmentação. O Cerrado é um domínio fitogeográfico que inclui o cerrado *sensu lato* (complexo de biomas formado por: campo topical, savanas – ou cerrado *strictu sensu* - e floresta estacional), floresta ripícola, campo ripícola, floresta estacional semidecídua, floresta estacional decídua, campo úmido, entre outros (Batalha 2011).

Segundo Sano *et al.* (2008), estes são os biomas mais fragmentados do Brasil. Sua área total original era de 204,7 milhões de hectares (IBGE 2004), a segunda maior do país, perdendo apenas para os biomas da Amazônia (Klink & Machado 2005). Ele expande-se pelos Estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Tocantins e São Paulo.

O Cerrado se desenvolveu em solos antigos, profundos, hidratados por aquíferos, ácidos e pobres em nutrientes, mas com elevado conteúdo de alumínio (Haridasan 2001). Outro fator determinante na estrutura e composição do Cerrado é o fogo, presente principalmente na época chuvosa devido aos raios (Moreira 2000). Além do Cerrado ser um *hotspot* mundial (Myers *et al.* 2000), como possui 44% das espécies vegetais endêmicas, é a savana tropical mais rica do mundo (Klink & Machado 2005).

A história de desmatamento no Cerrado teve início no período cafeeiro, mas se intensificou principalmente após extensivo uso de fertilizantes e correção do pH de seu solo para a agricultura, principalmente entre as décadas de 1960 e 1980 (Silva 2005). Atualmente, as principais pressões da agricultura sobre o Cerrado são a pecuária e as monoculturas de soja. Elas são responsáveis por desmatamentos ainda maiores que os observados na Amazônia (Klink & Machado 2005). Isto também se deve ao fato do código florestal atual prever apenas 20% da preservação do Cerrado (com exceção do Amazônico).

Nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul existem os menores valores de índice de cobertura vegetal natural, correspondendo a 15, 32 e 32% respectivamente (Sano

et al. 2008). No Estado de São Paulo, o Cerrado ocorre na forma de inúmeros fragmentos dispersos (menores que 100 ha), dos quais 5% estão localizados no interior de dez Unidades de Conservação (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo 1997).

Além das consequências da fragmentação já discutidas, apesar do Cerrado ser adaptado ao fogo, os regimes de queima de pastagens e da cana-de-acúcar na época seca resultaram em grandes problemas com a lixiviação, a compactação e erosão do solo. O fogo facilita a invasão de espécies exóticas altamente competitivas, principalmente de gramíneas africanas, as quais produzem grande quantidade de biomassa, que fica seca no inverno, funcionando como estopim para novos incêndios (Carmo *et al.* 2011; Klink & Machado 2005).

Agricultura

A agricultura convencionalmente praticada no Brasil tem exercido grande pressão sobre as espécies nativas. Além da demanda crescente por novas áreas de plantio que resultam em expansão da fronteira agrícola, há o uso de pesticidas, herbicidas e fertilizantes de modo descontrolado e com sérias consequências (Khanh *et al.* 2005).

O enriquecimento por nutrientes (como fertilização com nitrogênio) para sustentar o crescente número de pessoas e animais, tende a trazer plantas infestantes e exóticas invasoras, pois estes organismos estão adaptados e prosperam em ambientes eutrofizados. A maior parte da emissão antrópica de nitrogênio provém da queima dos combustíveis fósseis e dos fertilizantes. Esse nutriente pode afetar as áreas naturais diretamente através da contaminação do solo, ou da deposição do nitrogênio emitido na atmosfera em áreas naturais (Bobbink *et al.* 2010).

A demanda por novas terras ao plantio e expansão da fronteira agrícola é injustificável, uma vez que já foi demonstrado que o Brasil possui uma área desprovida de vegetação natural suficiente para acomodar a expansão da produção agrícola (Martinelli *et al.* 2010).

A agricultura não deve ser uma prática que se opõe a conservação da biodiversidade, pelo contrário, ambas devem caminhar juntas para uma melhor produção com maior desenvolvimento sustentável. O desenvolvimento sustentável é desenvolvimento econômico que satisfaz tanto as necessidades humanas por recursos presentes quanto futuras, enquanto minimiza impactos sobre a diversidade biológica (WRI/IUCN/UNEP 1992). Investir em infra-estrutura de unidades de conservação para melhorar a proteção à biodiversidade e

proporcionar oportunidades de renda às populações locais são diretrizes compatíveis com o desenvolvimento sustentável, bem como o desenvolvimento de alternativas para a produção agrícola necessária à vida humana (Primack & Rodrigues 2001).

Algumas das alternativas para a agricultura convencional são práticas de base agroecológicas como o plantio direto, rotação de culturas, agroflorestas, produção “orgânica”, controle biológico de insetos e plantas infestantes, bem como engenharia biológica de plantas que produzam metabólitos secundários com função pesticida ou herbicida e o uso de substâncias químicas menos agressivas ao meio ambiente (Singh *et al.* 2001; Khanh *et al.* 2005).

A biodiversidade presta serviços de valores diretos e indiretos muito importantes a agricultura, uma vez que promove o controle da erosão do solo, a manutenção de polinizadores, a ciclagem de nutrientes e água, oferece um banco genético de melhoramento e produção de medicamentos e defensivos de origem natural. Além disso, os recursos genéticos da biota brasileira precisam ser preservados, identificados e patenteados para que casos de biopirataria sejam evitados (Mascarenhas 2004; Primack & Rodrigues 2001).

Metabólitos secundários

As plantas produzem muitos compostos orgânicos que não parecem ter relação direta com o crescimento e desenvolvimento vegetal, denominados metabólitos secundários (Taiz & Zeiger 2009; Raven *et al.* 2010). Estes compostos estão localizados no terceiro nível da biodiversidade, o da diversidade genética. Isto porque uma maior variedade de combinações de genes proporciona uma grande gama de substâncias que poderão ser transcritas. Ao contrário dos metabólitos primários, os secundários são muito mais específicos de uma espécie ou um grupo de espécies. A importância destas substâncias só começou a ser estudada a partir do século XIX, onde houve interesse por sua aplicação em medicamentos, aromas e outros produtos (Yunes & Cechinel Filho 2001).

Uma vez que os vegetais são sésseis, necessitam de substâncias que possam protegê-los dos perigos que possam sofrer. Os metabólitos secundários podem proteger a planta contra a herbivoria e infecção por patógenos, e agir como atrativos aos polinizadores e dispersores, além de atuarem na competição planta-planta e na simbiose planta-microorganismo por meio da alelopátia (Larcher 2000; Oliveros-Bastidas 2008; Taiz & Zeiger 2009; Raven *et al.* 2010). Os metabólitos secundários podem ser chamados de bioativos e também exercem função de reconhecimento, defesa ou inibição de outras substâncias tóxicas (Larcher 2000). Sua

produção, acúmulo e liberação no ambiente pode ser influenciada por fatores ambientais (Gobbo-Neto & Lopes 2007) como a radiação solar (Tharayil & Triebwasser 2010), temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, textura do solo, microrganismos, ataque de insetos, disponibilidade de água e nutrientes (Chou 1986; Einhellig 1996; Blanco 2007), pela idade da planta (Larcher 2000) e de seus órgãos (Coley 1983; Raven *et al.* 2010).

De modo geral, os metabólitos secundários se dividem em três classes de substâncias químicas (Taiz & Zeiger 2009): os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados.

Terpenos

Os terpenos são a maior classe de metabólitos secundários existentes nas plantas. São em sua maioria polares e solúveis em água. Sua síntese ocorre a partir de acetil CoA (rota do ácido mevalônico) ou de moléculas glicosídicas como o piruvato e o 3-fosfoglicerato (rota do metileritritol fosfato ou MEP) (Dewick, 2002). Os terpenos são formados a partir da união de unidades de isopreno (C₅) e, portanto, são classificados pela quantidade de unidades C₅ que apresentem. Os terpenos contendo dez carbonos são chamados de monoterpenos, os com 15 carbonos são sesquiterpenos, e os com 20 carbonos são diterpenos. Compostos com 30 ou 40 carbonos são denominados triterpenos e tetraterpenos, respectivamente e, os com mais de 40 carbonos são nominados de politerpenóides.

Alguns terpenos têm papel importante no desenvolvimento vegetativo de plantas, podendo ser considerados metabólitos primários. Exemplos destes tipos de terpenos são as giberilinas, os esteróides de membrana celular, os carotenóides e o ácido abscísico. Como metabólitos secundários, os terpenos podem ser alelopáticos (Duke & Oliva 2004), inseticidas e repelentes contra insetos (como os piretróides e os óleos essenciais – misturas de monoterpenos e sesquiterpenos - mentol e limoneno) (Viegas Júnior 2003) e agentes contra infecções de patógenos (saponinas agem como detergentes rompendo as membranas de fungos e bactérias patogênicas) (Yang *et al.* 2006).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou fenóis possuem um anel aromático com um grupo hidroxila agregado (Waterman & Mole 1994). Sua síntese pode ocorrer a partir de Fenilalanina (rota do ácido chiquimico) ou Acetil CoA (rota do ácido mevalônico) (Smith 1976). A rota do ácido chiquimico, a mais comum nos vegetais, transforma fenilalanina em ácido cinâmico, liberando amônia. Esta reação é catalisada pela PAL (fenilalanina amônia

liase) e é influenciada por fatores ambientais como a presença de nutrientes no solo, temperatura e luz (Castro *et al.* 2005).

Entre os compostos fenólicos mais importantes estão os derivados de ácido benzóico, ácido cafeico e outros fenilpropanóides simples, cumarinas, ligninas, taninos e flavonóides (Larcher 2000). Os derivados do ácido benzóico, ácido cafeico, fenilpropanóides simples e cumarinas estão relacionados à atividade fitotóxica (Einhellig 2004). Os taninos, hidrolisáveis ou condensados, podem ser alelopáticos (Einhellig 2004) e comumente inseticidas e repelentes, pois costumam formar complexos proteicos difíceis de serem digeridos por herbívoros (Taiz & Zeiger 2009).

Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos existentes. Eles são oriundos da junção de compostos tanto da rota do ácido chiquímico como mevalônico. São constituídos de um esqueleto de 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos. Os flavonóides são categorizados em antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonóis e isoflavonas. As flavonas e flavonóis, geralmente, absorvem luz em comprimentos de UV, podendo funcionar como atrativos aos polinizadores e protetores de tecidos contra excesso de radiação (Ferreira *et al.* 2008). As flavonas e os flavonóis são descritos ainda como alelopáticos mediadores da interação planta-bactérias simbiotes e do desenvolvimento de vegetais competidores (Einhellig 2004). As isoflavonas são descritas como inseticidas (Almeida, 2010) e como repositores de estrogênio humano (Esteves & Monteiro 2001).

Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados de metabolismo secundário são os alcalóides, os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos e os aminoácidos não proteicos (Taiz & Zeiger 2009).

Os alcalóides são bastante comuns nos vegetais. Eles possuem um átomo de nitrogênio em um ou mais anéis heterocíclicos de carbono e é sintetizado a partir de aminoácidos comuns como lisina, tiamina e triptofano, e outro aminoácido oriundo das rotas dos terpenos (Taiz & Zeiger 2009; Larcher 2000). São alcalinos e solúveis em água. Muitos apresentam ação contra herbívoros (nicotina e a estricnina, por exemplo) porque são amargos, ou são fármacos importantes (como a morfina, cocaína, codeína, escapolamina) ou podem ser alelopáticos (Blum 2004).

Os glicosídeos cianogênicos protegem as plantas contra a predação, uma vez que são convertidos em ácido cianídrico no trato digestório dos herbívoros (Vetter 2000). Esse

composto está presente, por exemplo, em mandiocas selvagens. Os glucosinolatos liberam em sua decomposição, substâncias de defesa vegetal, característica do odor de brassicáceas (como o repolho, brócolis e rabanete), e essas substâncias agem como toxinas e repelentes contra herbívoros (Thuler *et al.* 2007).

Os aminoácidos não-proteicos estão presentes nos vegetais de forma livre e exercem papel de protetoras contra o ataque de herbívoros devido a sua elevada toxicidade. Eles atuam substituindo os aminoácidos protéicos em suas estruturas, tornando-as inativas (Taiz & Zeiger 2009).

Apesar de metabólitos secundários de plantas serem geralmente associados com as respostas de defesa da planta contra herbívoros e patógenos, podem estar envolvidos em uma ampla variedade de funções ecológicas. As plantas liberam metabólitos secundários que podem alterar a constituição química do solo, aumentando assim a sua absorção de nutrientes ou proteção contra a toxicidade de metais (Weidenhamer & Callaway 2010). Metabólitos secundários também são essenciais para mediar as interações entre as raízes das plantas e bactérias simbióticas (Dakora & Phillips 2002) e na comunicação direta entre plantas (Bertin *et al.* 2003; Weir *et al.* 2004).

Alelopatia

Este fenômeno foi documentado pela primeira vez em cerca de 300 a.C. por escritores gregos e romanos, mas apenas em 1937 Hans Molisch denominou "alelopatia" como interações planta-planta (Rice 1984). O termo alelopatia é formado pela junção das palavras latinas *allelon* (recíproco) e *pathos* (influência). Atualmente é definido como qualquer efeito direto ou indireto de compostos químicos de plantas em outra planta ou microrganismo. Segundo a definição da Sociedade Internacional de Alelopatia, o termo diz respeito a qualquer processo que envolva metabólitos secundários, ou até primários, produzidos pelas plantas e microrganismos, influenciando o crescimento e o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (Torres *et al.* 1996).

A alelopatia é reconhecida como um importante mecanismo ecológico, que influencia a dominância e a sucessão das plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas (Chou 1986; 1999). As substâncias que apresentam atividade alelopática, ou os "aleloquímicos", podem estar presentes em diversos órgãos das plantas, como folhas, caules, raízes, flores e frutos (Weir *et al.* 2004). As plantas podem liberar esses compostos no ambiente de diversas maneiras: pela decomposição de matéria vegetal, como

lixiviados no solo, volatilização das substâncias, ou liberação dos exsudatos radiculares (Ferreira & Aquila 2000; Bertin *et al.* 2003). Alguns trabalhos demonstram a importância da microbiota do solo em alterar a atividade dos aleloquímicos (Inderjit *et al.* 2008; Kaur *et al.* 2009). Indicativos visuais de atividade alelopática numa área são aros ao redor de plantas sem nascimento de plântulas da mesma ou de outras espécies, regeneração natural inadequada de áreas degradadas, agrupamentos de plantas da mesma espécie, entre outros (Kruse *et al.* 2000).

O processo de alelopátia vem sendo observado tanto em ambientes naturais como em áreas cultivadas, causando inúmeras implicações, tanto ecológicas como econômicas, tais como o declínio de produções agrícolas e problemas na regeneração de áreas naturais (Kruse *et al.* 2000). Assim, a vegetação de uma determinada área pode ser um modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias que possam liberar no ambiente (Ferreira 2004).

Como espécies vegetais provenientes de Cerrado estão submetidas a solos oligotróficos, nutrientes tornam-se custosos. Para se protegerem de predação, costumam a apresentar síndromes de defesa tais como folhas coriáceas, tricomas, quantidades elevadas de compostos fenólicos e taninos (Marquis *et al.* 2002; DaSilva & Batalha 2011). Diversos trabalhos têm demonstrado atividade alelopática de espécies nativas de muitas famílias do cerrado, utilizando-se diferentes metodologias, *e.g.* *Miconia albicans* Triana (Melastomaceae), *Lantana camara* L. (Verbenaceae), *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit (Fabaceae) e *Drimys winteri* Forst (Winteraceae) (Gorla *et al.* 1997), *Ouratea spectabilis* Mart. (Ochnaceae), *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), *Pouteria ramiflora* Mart. (Sapotaceae) e *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Fabaceae) (Silva *et al.* 2006), *Baccharis draccunculifolia* D.C. (Rozete *et al.* 2007), *Andira humilis* Mart. Ex. Benth (Periotto *et al.* 2004) e *Machaerium acutifolium* Vog. (Povh *et al.* 2007) (Fabaceae), *Eugenia dysenterica* Mart. Ex. DC. Berg. (Myrtaceae) (Giotto *et al.* 2007), *Joanesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) e *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) (Capobianco *et al.* 2009), *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze (Aristolochiaceae) (Gatti *et al.* 2010), *Solanum* sp (Solanaceae) (Oliveira 2009), além de diversas espécies de Myrtaceae (Imatomi 2010).

A germinação e o desenvolvimento das plantas podem ser afetados quando expostos aos aleloquímicos. Na maioria das vezes, há retardo ou inibição da germinação e redução do crescimento inicial de coleóptilos e plântulas (Kruse *et al.* 2000; Ferreira 2004). Microscopicamente, os aleloquímicos podem agir diretamente na inibição dos componentes do fotossistema II, interrupção da respiração e da síntese de ATP, na indução da formação de

espécies reativas ao oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, morte celular (Weir *et al.* 2004) e, em outras modificações no metabolismo das plantas vizinhas, incluindo atividade enzimática, relações hídricas, níveis de hormônio, disponibilidade de minerais, divisão e alongação celular, estrutura e a permeabilidade de membranas e paredes celulares (Rice 1984; Chou 1999; Reigosa *et al.* 1999; Gniazdowska & Bogatek 2005).

Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações, bem como as plantas receptoras podem ser seletivas em suas respostas (Seigler 1996). As plantas receptoras podem se defender dos aleloquímicos através de processos de desintoxicação que ocorrem paralelamente à formação de ROS nas células, o que torna difícil resumir os efeitos dos aleloquímicos (Gniazdowska & Bogatek 2005).

Substâncias alelopáticas têm sido descritas como “armas novas” de espécies invasoras exóticas para se estabelecerem rapidamente em um ambiente (Callaway & Aschehoug 2000). O poder competitivo de plantas que liberam substâncias alelopáticas pode ser ainda maior quando também competem por recursos no ambiente (Ridenour & Callaway 2001; Callaway & Ridenour 2004). As plantas invasoras podem alterar propriedades físicas e químicas do solo através de seus aleloquímicos e, assim, aumentar o potencial de retenção de nutrientes (Weidenhamer & Callaway 2010). Esse tipo de ação é classificado como alelopatia indireta (Ferreira & Aquila 2000).

Nos sistemas agrícolas, a alelopatia pode ocorrer entre culturas, entre culturas com resíduos (ou palha) e entre as culturas com plantas infestantes (exóticas ou nativas), sendo, portanto, um evento de importância econômica (Kruse *et al.* 2000). A rotação de culturas é uma prática importante do ponto de vista da manutenção dos nutrientes do solo, mas por outro lado, dependendo da cultura anterior, pode trazer sérios prejuízos (Ferreira & Aquila 2000). A palha do sorgo, por exemplo, libera a quinona sorgoleone no solo que irá afetar a germinação e o crescimento das próximas culturas (Gonzalez *et al.* 1998). Por outro lado, alguns pesquisadores têm tentado modificar culturas para que apresentem maior quantidade de aleloquímicos e deste modo ser mais resistentes contra suas competidoras (Kruse *et al.* 2000; Dixon 2005).

Uma vez evidenciada a ação alelopática, pode-se fazer uso destes compostos no combate às plantas invasoras de muitas culturas agrícolas (Ferreira & Aquila 2000). Vários esforços estão sendo realizados na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais com o manejo das invasoras, utilizando sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, adubação verde, além de sistemas agroecológicos (Wu *et al.* 2000; Khan *et al.* 2002; Kato-Noguchi 2003; Khanh *et al.* 2005).

Outro tipo de pesquisa que pode ser realizada é a procura e o desenvolvimento de herbicidas de origem natural, através do isolamento identificação e síntese de aleloquímicos (Kruse *et al.* 2000; Ferreira 2004; Macías *et al.* 2008). Segundo Yunes & Cechinel Filho (2001), a química combinatória moderna não conseguiu, pelo menos em parte, ser a fonte primária da descoberta de novas substâncias de interesse biológico e fez necessário que os cientistas voltassem-se aos produtos naturais, combinados infinitamente pela evolução durante milhões de anos. Como a quantidade de compostos naturais na natureza é enorme, é importante que sejam realizados estudos biodirigidos que levem mais diretamente a descoberta das substâncias de interesse, com menor tempo e custo (Cechinel Filho & Yunes, 2001).

Isolamento e purificação de produtos naturais

Para o isolamento e purificação de um produto natural de interesse, os extratos e frações destes extratos devem ser testados biologicamente e submetidos a procedimentos cromatográficos e de caracterização estrutural (Cechinel Filho & Yunes, 2001). Uma das primeiras etapas de fracionamento dos extratos é a cromatografia de coluna aberta, que possui sílica gel (de fase normal ou reversa) ou Sephadex como fase estacionária, e é eluída com misturas de solventes determinadas em cromatografia de camada delgada (CDD). A CDD também servirá para reunir frações da coluna cromatográficas com aspecto semelhante. As frações podem ser então submetidas a novas colunas cromatográficas que refinem o isolamento dos compostos de interesse.

Após os fracionamentos em coluna, as frações ou sub-frações devem, ser levadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é muito sensível para detectar os componentes presentes na mistura. Os fracionamentos biodirigidos e o desenvolvimento de metodologias analíticas, como análises de difração de raio-X, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e infravermelho trouxeram novas ferramentas para o desenvolvimento de herbicidas de origem natural que permitem elucidar as estruturas químicas até mesmo em pequenas quantidades de material (Macías *et al.* 2007a).

Estes herbicidas podem apresentar meios alternativos de ação, interações mais específicas com as espécies infestantes, menor meia vida (Macías *et al.* 1998) e apresentar atividade fitotóxica em menores concentrações que os herbicidas sintéticos (Macías *et al.* 2008). Há relatos de atividade alelopática em taninos, terpenos, glicosídeos cianogênicos, flavonóides e ácidos fenólicos como p-coumárico, vanílico, ácido benzóico, entre outros

(Macías *et al.* 2007b). Alguns trabalhos também demonstram que os aleloquímicos podem agir sinergicamente, ou seja, são mais ativos juntos do que quando separados (Moraes, 2010).

As espécies escolhidas

Rapanea ferruginea (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* Mart. (Primulaceae) são espécies com ampla abundância e distribuição no Estado de São Paulo, Brasil (Wanderley *et al.* 2005). Em campo, são observadas em agrupamentos (observação pessoal em campo). *R. ferruginea* é uma espécie arbórea, perenifólia e heliófila (Pinheiro & Carmo 1993) e pioneira, característica de formações vegetais secundárias, apresentando 1-11m de altura (Wanderley *op cit*) (Figura I.1). Possui a extremidade dos ramos ferrugíneo - velutina, com folhas lanceoladas, lâmina oboval a oboval - elíptica com ápice agudo, membranácea com canais resiníferos e glândulas secretoras diminutas esparsas por toda face abaxial, visível com o auxílio de lupa. Está distribuída do México ao Brasil e seus nomes vulgares são canela-azeitona, capororoca, azeitona-do-mato, camará, capororocaçu, capororoca-vermelha, pororoca, capororoca-mirim.



Figura I.1 - *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (Primulaceae). Indivíduo adulto (à esquerda) e jovem (ao meio) na área de cerrado da UFSCar. À direita, exsicata da espécie depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (Voucher 7276). Fotos: Paula Novaes.

R. umbellata é uma espécie arbórea, polimorfa, perenifólia e heliófaga, apresentando de 1,5 a 8 m de altura (Wanderley *op.cit.*). Está presente em sub-bosque, secundária inicial ou clímax exigente em sombra (Carvalho 2006), com ampla distribuição e abundância desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul, Brasil (Wanderley *et al.* 2005) (Figura I.2). Possui folhas com lâmina cartácea a coriácea, glabras, elípticas ovaladas, ápice obtuso a arredondado, base aguda, revoluta, pontuações glandulares e canais resiníferos curtos presentes na face abaxial. Seus nomes populares são copororoca-verdadeira, capororocão, pororoca, entre outros.



Figura I.2 - *Rapanea umbellata* Mart (Primulaceae). Indivíduo adulto (à esquerda) e jovem (ao meio) na área de cerrado da UFSCar. À direita, exsicata da espécie depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (Voucher 7278). Fotos: Paula Novaes.

R. umbellata e *R. ferruginea* apresentaram diferentes composições químicas em extratos foliares de diclorometano (Januário *et al.* 1992). Neste trabalho, *R. ferruginea* havia sido identificada como *R. lancifolia* Mez. Ambas as espécies deram origem a terpenos- ρ -ácido hidroxibenzóicos. No entanto, *R. ferruginea* e *R. umbellata* apresentaram dois compostos semelhantes: um ácido benzóico (3-geranil-4-hidroxi-5-(3'',3''-dimetilalil)-ácido benzóico) e um dihidrobenzofurano (5-carboni-7-(3'',3''-dimetilalil)-2-(1'-hidroxi-1',5'-dimetilex-4'-enil)-2,3-dihidrobenzofurano), mas *R. umbellata* apresentou ainda um dihidrobenzopirano (6-carboxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-3 α -hidroxi-2 α -metil-2-(4'-metilpent-3'-enil)-3,4-dihidrobenzopirano). Deste modo, estas espécies podem apresentar atividade alelopática, já que se estabelecem em agrupamentos e possuem estruturas morfológicas na folha e substâncias químicas que podem ser tóxicas.

Hipóteses e objetivos

A hipótese desta tese é que devem existir substâncias alelopáticas em espécies de *Rapanea* que favoreçam o seu estabelecimento no cerrado e que estas devem ser influenciadas por fatores sazonais ou pela idade das plantas. A alelopatia deve ocorrer pela liberação de aleloquímicos no ambiente e estes podem apresentar importância econômica, servindo de modelos para a produção de herbicidas de origem natural, menos agressivos ao meio ambiente. Os objetivos desta tese são:

- Observar a influência da sazonalidade da região de coleta e da idade das plantas de *Rapanea ferruginea* e *R. umbellata* sobre a atividade alelopática de seus extratos aquosos foliares.

- Comparar o efeito do extrato aquoso foliar de *R. umbellata* com a atividade de um herbicida sintético sobre variáveis de germinação e de crescimento inicial das espécies infestantes de culturas agrícolas.

- Bioprospectar, purificar e isolar metabólitos secundários das folhas de *R. umbellata* provenientes do cerrado que apresentem atividade alelopática.

Referências bibliográficas

- Almeida, M.N. 2010. Eficiência de um inseticida botânico no controle de ninfas de *Euphalerus clitoriae* (hemiptera: psyllidae). **Revista Controle Biológico (BE-300) On-Line**. http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada
- Batalha, M.A. 2011. The Brazilian Cerrado is not a biome. **Biota Neotropica** <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/abstract?point-of-view+bn00111012011>.
- Bernardes, A.T. 1999. **Valores socioculturais de unidades de conservação: herança natural e cultural do homem**. Brasília, Mimeo.
- Bertin, C., Yang, X. & Weston, L. A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil** **256**: 67–83.
- Blanco, J.A. 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modeling** **209**: 65-77.
- Blum, M.S. 2004. The importance of alkaloidal functions. Pp. 163- 182. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.

- Bobbink R., Hicks K., Galloway J., Spranger T., Alkemade R., Ashmore M., Bustamante M., Corderby S., Davidson E., Dentener F., Emmett B., Erisman J.W., Fenn M., Gilliam F., Nordin A., Pardo L. & Vries, W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. **Ecological Applications** **20**: 30–59.
- Callaway, R.M. & Aschehoug, E. T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. **Science** **290**: 521-523.
- Callaway, R.M. & Ridenour, W.M. 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment** **2**: 436-443.
- Capobianco, R.A., Vestena, S. & Bittencourt, A.G.C. 2009. Alelopatia de *Joanesia princeps* Vell. e *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **19**: 924-930.
- Carmo, A.B., Vasconcelos, H.L. & Araujo, G.M. 2011. Estrutura da comunidade de plantas lenhosas em fragmentos de cerrado: relação com o tamanho do fragmento e seu nível de perturbação. **Revista Brasileira de Botânica** **34**: 31-38.
- Carvalho, P.E.R.C. 2006. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Embrapa Informação tecnológica, Brasília- DF.
- Castro, A.H.F., Alvarenga, A.A., Soares, A.M., Young, M.C.M., Purcino, A.A.C. 2005. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** **7**: 45-55.
- Cechinel Filho, V., Yunes, R. A. 2001. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. Pp. 47-76. In: Yunes, R. A. & Calixto, J.B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó, Argos Editora Universitária.
- Chou, C.H. 1986. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. Pp. 57-73. In: Putnam, A.R. e Tang, C.S. **The science of allelopathy**. New York, John Wiley & Sons.
- Chou, C.H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science** **18**: 609-636.
- Coley, P.D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. **Ecological monographs** **53**: 209-233.
- Dakora, F.D. & Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil** **245**: 35–47.

- DaSilva, D.M. & Batalha, M.A. 2011. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology** **212**:181–193.
- Dewick, P.M. The Mevalonate And Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids And Steroids. Pp. 167-231. **Medicinal Natural Products**. John Wiley & Sons, Ltd. 2002. University of Nottingham, UK.
- Dixon, R. A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. **Current Opinion in Plant Biology** **8**: 329–336.
- Duke, S.O. & Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal** **88**: 886-893.
- Einhellig, F.A. 2004. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Esteves, E.A. & Monteiro, J.B.R. 2001. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição** **14**: 43-52.
- Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente de ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal** **12**: 175-204.
- Ferreira, A.G. 2004. Interferência: competição e alelopatia. Pp. 251-264. In: Ferreira, A.G. & Borghetti (Ed). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre. Artmed.
- Ferreira, M.M.M., Oliveira, A.H.C., Santos, N.S. 2008. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On-line** **2**: 57-60.
- Gatti, A.B., Ferreira, A.G., Arduin, M. & Perez, S.C.G.A. 2010. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artistolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica** **24**: 454-461.
- Giotto, A.C., Oliveira, S.C.C & Silva, J.G.P. 2007. Efeito alelopático de *Eugenia dysinterica* Mart. Ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências** **5**: 600-602.
- Gniazdowska, A. & Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum** **27**: 395-407.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** **30**: 374-381.

- Gonzalez, V.; Nimbal, C.I.; Weston, L.A. & Cheniae, G.M. 1998. Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by sorgoleone, a natural product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **45**: 1415-1421.
- 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 *Drymys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista Brasileira de Sementes** **19**: 260-265.
- Haridasan, M. 2001. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. Pp. 68-83. In: McClain, M.E., Victoria, R.L; Richey, J.E. (ed). **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. New York, Oxford University Press.
- IBGE. 2004. **Mapa de biomas do Brasil**. Rio de Janeiro. IBGE. <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>.
- Imatomi, M. 2010. **Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Inderjit, Pollock, J.L., Callaway, R.M. & Holben, W. 2008. Phytotoxic effects of (±)-catechin *in vitro*, in soil, and in field. **Plos One** **3**: e2536.
- Januário, A.H, Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. & Fernades, J.F. 1991. Terpeno-*p*-hydroxybenzoic acid derivates from *Rapanea umbellata*. **Phytochemistry** **30**: 2019-2023.
- Januário, A.H, Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. & Fernades, J.F. 1992. Dammarane and cycloartane triterpenoids from three *Rapanea* species. **Phytochemistry** **31**: 1251-1253.
- Kato-Noguchi, H. 2003. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm. **Scientia Horticulturae** **97**: 419-423.
- Kaur, H., Kaur, S., Baldwin, I.T. & Inderjit. 2009. Taking ecological function seriously: soil microbial communities can obviate allelopathic effects of released metabolites. **Plus One** **4**: e4700
- 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**: 1871-1885.
- Khanh, T.D., Chung, M.I., Xuan, T.D. & Tawata, S. 2005. The exploration of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy & Crop Science** **191**: 172-184.

- Klink, C.A. & Machado, R.B. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology** **19**: 707–713.
- Kruse, M., Strandberg, M. Strandberg, B. 2000. **Ecological effects of allelopathic plants – a review**. Ministry of Environment and Energy of Denmark. National Environmental Research Institute.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos. Rima Editora.
- Macías, F. A., Oliva, R. M., Simonet, A. M. & Galindo, J. C. G. 1998. What are allelochemicals? Pp. 69-79. In: Olofsson, M. (ed.). **Allelopathy in rice**. Manilla. IRRI Press.
- Macías, F.A., Galindo, J.L.C. & Galindo, J.C.G. 2007a. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry** **68**: 2917–2936.
- Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M. & Galindo, J.C.G. 2007b. Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science** **63**: 327–348.
- Macías, F.A., Oliveiros-Bastidos, A., Marin, D., Carrera, C., Chinchilla, N. & Molinillo, J.M.G. 2008. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review** **7**: 179-194.
- Martinelli, L.A., Joly, C.A., Nobre, C.A. & Sparovek, G. 2010. A falsa dicotomia entre a preservação da vegetação natural e a produção agropecuária. **Biota Neotropica** **10**: 323-330.
- May, R.M. 2010. Ecological science and tomorrow’s world. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **365**: 41-47.
- Moraes, L.P.S. 2010. **Conservação, germinação e efeitos alelopáticos de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne**. Tese (Doutorado). São Carlos. Universidade Federal de São Carlos.
- Mascarenhas, G. 2004. A biodiversidade brasileira no âmbito do acordo das TRIPS. **Revista Brasileira de Inovação** **3**: 393-416.
- Moreira, A. 2000. Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. **Journal of Biogeography** **27**:1021-1029.
- Mota, J.A. 2003 Valorização de recursos naturais: expandindo as fronteiras econômicas, restringindo as fronteiras ambientais. In: Nascimento, E.P., Drummond, J.A. (Ed.). **Amazônia: dinamismo econômico e conservação ambiental**. Rio de Janeiro, Garamond.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** **403**: 853-858.

- Odum, E.P. & Barrett, G.W. 2011. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo. Cengage Learning.
- Oliveira, S.C. 2010. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Oliveros-Bastidas, A.J. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva 7**: 1-34.
- 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 Botânica Brasílica 18**: 425-430.
- Pinheiro, A.L. & Carmo, A.P.T. 1993. Contribuição ao estudo tecnológico da canela-azeitona, *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez, uma espécie pioneira. I. Características anatômicas da madeira. **Ciência Flor 3**: 121-145.
- 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**: 447-449.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E. 2001. **Biologia da Conservação**. Londrina. Editora Planta.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2010. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A. & Gonzáles, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science 18**: 577-608,
- Rice, E. 1984. **Allelopathy**. Orlando. Academic Press.
- Ridenour, W.M. & Callaway, R.M. 2001. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. **Oecologia 126**: 444-450.
- Rozete, F.S.S., Oliveira, P.A., Gusman, G.S., Valetim, 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**: 513-515.
- Sano, E.E., Rosa, R.R., Brito, J.L.S. & Ferreira, L.G. 2008. Mapeamento semi-detalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 43**: 153-156.
- Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 1997. **Bases para a conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do Estado de São Paulo**. São Paulo. Série Probio/SP.
- Seigler, D. S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal 88**: 876- 885.

- Silva, L.L. 2005. O papel do estado no processo de ocupação das áreas de cerrado entre as décadas de 60 e 80. **Caminhos de Geografia 1**: 24-36.
- Silva, G. B. da, Martim, L., Silva, C. L. da, Young, M. C. M. & Ladeira, A. M. P. 2006. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Hoehnea 33**: 331-338.
- Simberloff, D. 1986. Are we on the verge of a mass extinction in tropical rain forests? Pp. 165–180. In: Elliott, D.K. (ed.). **Dynamics of Extinction**. New York. John Wiley & Sons.
- Singh, H.P., Batish, D.R. & Kohli, R. K. 2001. Allelopathy in agroecosystem: an overview. **Journal of Crop Production 4**: 1-42.
- Smith, P.M. 1976. **The chemotaxonomy of plants**. Edward Arnold, Bristol.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed.
- Tharayil, N. & Triebwasser, D. J. 2010. Elucidation of a diurnal pattern of catechin exudation by *Centaurea stoebe*. **Entomology Soils & Plant Sciences 36**: 200-204.
- Thuler, R.T., De Bortoli, S.A. & Hoffmann-Campo C.B. 2007. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e à presença de glucosinolatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 42**: 467-474.
- Torres, A., Oliva, R. M., Castellano, D. & Cross, P. 1996. **A Science of the Future**. Cadiz. First World Congress on Allelopathy.
- Vetter, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon 38**: 11-36.
- Viegas Júnior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova 26**: 390-400.
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S. & Giulietti, A.M. 2005. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Carlos. Rima Editora.
- Waterman, P.G. & Mole, S. 1994. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, London.
- Weidenhamer, J. D. & Callaway, R. M. 2010. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of Chemical Ecology 36**:59–69.
- Weir, T. L., Park, S. & Vivanco, J. M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology 7**: 472–479.
- Wilson, E. 2002. **O futuro da vida: um estudo da biosfera para a proteção de todas as espécies, inclusive humana**. Rio de Janeiro. Editora Campus.
- WRI/IUCN/UNEP. 1992. **World Resources**. New York. Oxford University Press.

- 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**: 2141-2154.
- Yunes, R.A. & Cechinel Filho, V. 2001. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidentais e orientais. Pp. 17 – 44. In: Yunes, R. A. & Calixto, J.B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó, Argos Editora Universitária.
- Yang, C.R., Zhang, Y., Jacob, M.R., Khan, S.I., Zhang, Y.J., and Li, X. C. 2006. Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **50**: 1710–1714.

CAPÍTULO 1.

Influência do estágio de desenvolvimento e da sazonalidade no potencial alelopático de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae).

RESUMO

(Influência do estágio de desenvolvimento e da sazonalidade no potencial alelopático de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae). A intensidade dos efeitos alelopáticos de uma planta pode depender do hábitat, da idade e das estações do ano em que forem coletadas. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da idade e da sazonalidade sobre a atividade alelopática de extratos foliares aquosos de indivíduos de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata*. Foram realizados bioensaios de germinação e comprimento inicial dos diásporos de alface e cebola e sementes de tomate sob influência dos extratos foliares aquosos de indivíduos adultos e jovens provenientes de estação chuvosa e seca. As concentrações dos extratos foram de 10 ou 5% (m/v) ou água destilada (controle). Todos os extratos foliares de *R. umbellata* e *R. ferruginea* apresentaram atividade alelopática. A sazonalidade foi o fator que mais afetou a atividade alelopática das duas espécies. A estação seca condicionou extratos foliares com maior frequência de atividade alelopática que a estação chuvosa. A idade das plantas influenciou diferentemente as espécies estudadas, sendo que os maiores valores de frequência de atividade alelopática foram observados em folhas de plantas adultas de *R. umbellata* e de plantas jovens de *R. ferruginea* provenientes de mesma estação climática.

Palavras-chave: Comprimento inicial, Entropia informacional de germinação, Porcentagem de germinação, Idade, Sazonalidade.

ABSTRACT

(Development stage and seasonality influences on allelopathic potential of *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. and *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae)). The intensity of allelopathic effects on plants can depend on their habitat, age and the season in which they were collected. The aim of this work was to compare age and seasonality effects on the allelopathy of aqueous leaf extracts of *Rapanea ferruginea* and *Rapanea umbellata*. Bioassays of germination and initial length of lettuce and onion diaspores and tomato seeds were performed under the influence of aqueous leaf extracts of adults and young individuals from rainy and dry seasons. The extract concentrations were 10 or 5% (weight/volume), or distilled water (control). All leaf aqueous extracts showed allelopathic activities. Seasonality was the more important factor affecting the allelopathy of the studied *Rapanea* species. The dry season conditioned leaf extracts with higher allelopathic activity frequency than rainy season. Plants age was a factor that influenced the species differently, since higher values of allelopathic activity frequency were observed in leaves of adult plants in *R. umbellata* and young plants in *R. ferruginea* from the same season.

Key-words: Age, Germination informational entropy, Germination, Initial length, Seasonality.

INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente e, portanto, podem variar sazonalmente, espacialmente e interespecificamente

(Gobbo-Neto & Lopes 2007). Os metabólitos secundários das plantas são liberados no ambiente por meio da sua volatilização e lixiviação, decomposição de seus tecidos no solo e exudação nas raízes (Ferreira & Aquila 2000). Eles podem apresentar atividade alelopática, ou seja, estarem envolvidos nos processos de influência entre uma planta e outra, seja de modo favorável ou prejudicial (Ferreira & Aquila 2000). A produção de aleloquímicos pelas plantas pode ser regulada por fatores ambientais como temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, textura do solo, microrganismos, ataque de insetos e disponibilidade de água e nutrientes (Chou 1986; Einhellig 1996; Blanco 2007).

A sazonalidade é um dos fatores que pode determinar a produção de aleloquímicos (Chou 1986). Einhellig (1996) enfatiza que ela pode modificar a taxa de produção dos aleloquímicos e aumentar a concentração destes compostos, propiciando uma maior interferência nas plantas receptoras. No continente europeu, por exemplo, a estação chuvosa (inverno) condicionou maiores concentrações de quinonas (fenóis) em *Rheum undulatum* L. (Paneitz & Westendorf 1999), de terpenos em *Buplerum fruticosum* L., *Pinus halepensis* Mill. (Llusià & Pañuelas 2000) e *Cistus albidus* L. (Llusià *et al.* 2000; Llusià *et al.* 2010) e monoterpenos em *Santolina rosmarinifolia* L. (Pala-Paúl *et al.* 2001) do que a estação seca (verão). Muitos dos trabalhos relacionados com a influência de fatores ambientais sobre metabólitos secundários são realizados em plantas provenientes de climas temperados (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

No Cerrado (savana brasileira), os déficits hídricos sazonais presentes nas camadas superficiais de seu solo oligotrófico (Klink & Machado 2005; Haridasan 2001) poderiam resultar em uma maior quantidade de aleloquímicos. Alguns trabalhos demonstram que a estação seca no Cerrado condicionou extratos foliares aquosos mais alelopáticos que os provenientes de folhas coletadas em período chuvoso (Gatti 2008) e outros trabalhos afirmam que a influência da sazonalidade pode ser dependente da espécie (Oliveira 2009).

Outro fator que pode influenciar a produção e ação dos aleloquímicos é a idade dos órgãos das plantas. Folhas jovens da maioria das 46 espécies arbóreas estudadas em uma floresta úmida na América Central apresentavam mais taninos e fenóis que as folhas adultas (Coley 1983). As espécies *Copaifera pubiflora* Benth., *C. officinalis* (Jacq.) L., *C. venezuelana* Harms & Pittier e *C. langsdorfii* Desf. apresentaram menores concentrações no conteúdo de fenol em suas folhas quando ficaram maduras (Langenheim *et al.* 1986). Neste mesmo trabalho, o conteúdo de terpenos variou durante os estágios da planta, dependendo da espécie estudada. Extratos preparados com folhas mais novas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) inibiram mais fortemente a germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate

(*Solanum lycopersicum* L.), enquanto os extratos de folhas mais velhas não apresentaram efeito (Marchi *et al.* 2008). Folhas jovens devem apresentar proteção contra herbívoros, mas os indivíduos jovens devem ainda apresentar compostos relacionados à alelopatia, já que competem com outros indivíduos para o seu estabelecimento no ambiente.

Rapanea ferruginea (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) são duas das espécies com maior abundância e distribuição no Estado de São Paulo, Brasil (Wanderley *et al.* 2005). Elas são arbóreas, heliófilas e perenifólias (Pinheiro & Carmo 1993). Espécies perenifólias podem apresentar maior quantidade de fenóis em suas folhas, já que são compostos que permanecem nas folhas pelo maior tempo possível devido ao seu alto custo nutricional (Coley *et al.* 1985). Além disso, as duas espécies possuem folhas com canais resiníferos e glândulas secretoras diminutas esparsas por toda face abaxial (Wanderley *et al.* 2005), que podem acumular terpenos ou taninos (Mauseth 1988). Fenóis, terpenos e taninos tem sido relacionados à atividade alelopática (Einhellig 2004; Duke & Oliva 2004).

Assim, a hipótese deste trabalho é que extratos foliares de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata* devem apresentar atividade alelopática e que esta deve ser influenciada pela sazonalidade da região de coleta e pelo estágio de desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar qual estação climática e estágio de desenvolvimento condicionam maior atividade alelopática nas folhas de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata*. Além disso, pretendeu-se averiguar se estas duas espécies de mesmo gênero respondem semelhante ou diferentemente a estes fatores.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies doadoras, caracterização geográfica e climática do local de coleta

As coletas foram realizadas de forma assistemática na reserva de cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) *campus* São Carlos, SP (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). Folhas saudáveis e totalmente expandidas de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (Primulaceae Batsch ex Borkh.) e de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae Batsch ex Borkh.) foram coletadas de dez indivíduos jovens e dez indivíduos adultos em estação chuvosa (fevereiro de 2008) e seca (julho de 2008). Os indivíduos jovens de *R. ferruginea* apresentavam diâmetro na altura do solo (DAS) de 1,5 a 4,5 cm e, os adultos, de 9 a 20 cm. Os indivíduos jovens de *R. umbellata* apresentavam DAS de 0,9 a 2,5 cm e, os adultos, de 3,0 a 15,5 cm. Os indivíduos adultos também apresentavam estruturas

reprodutivas ou seus indicativos nos caules. As exsiccatas de *R. umbellata* e *R. ferruginea* foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar – Brasil (vouchers 7276 e 7278, respectivamente).

A reserva de cerrado supracitada apresenta solo Latossolo Vermelho-Amarelo Álico, com ondulações suaves e está a 845 m de elevação (Lorandi *et al.* 1999). O clima da região segundo a classificação de KÖPPEN é do tipo CWA, tropical com inverno seco (de junho a setembro) e verão quente e úmido (de dezembro a março) (Tolentino 1967). As médias históricas anuais de precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e déficit de pressão de vapor são aproximadamente 1506 mm, 71%, 21 °C e 0,72 kPa, respectivamente (Damascos *et al.* 2005). O fotoperíodo varia entre 10,6 h (inverno) e 13,3 h (verão) (Tolentino 1967).

As médias mensais de temperatura máxima, média e mínima e as precipitações mensais totais durante o ano de 2008 foram obtidas na estação meteorológica número 83726 da UFSCar - São Carlos - SP. Os três meses anteriores das coletas também foram considerados para melhor caracterizar o período (Figura 1.1). Os maiores valores de precipitação total ocorreram de novembro de 2007 a abril de 2008 (Figura 1.1). Em fevereiro de 2008 (mês das coletas na estação chuvosa), a precipitação total foi de 191 mm e as médias mensais das temperaturas máxima, média e mínima foram 28,5, 23,5 e 18,5 °C, respectivamente (Figura 1.1). A precipitação total foi menor de maio a novembro de 2008 (Figura 1.1). Em julho de 2008 (mês das coletas na estação seca), não houve precipitação e a média mensal das temperaturas máxima, média e mínima eram de 25,5, 18,5, e 11,5 °C, respectivamente (Figura 1.1).

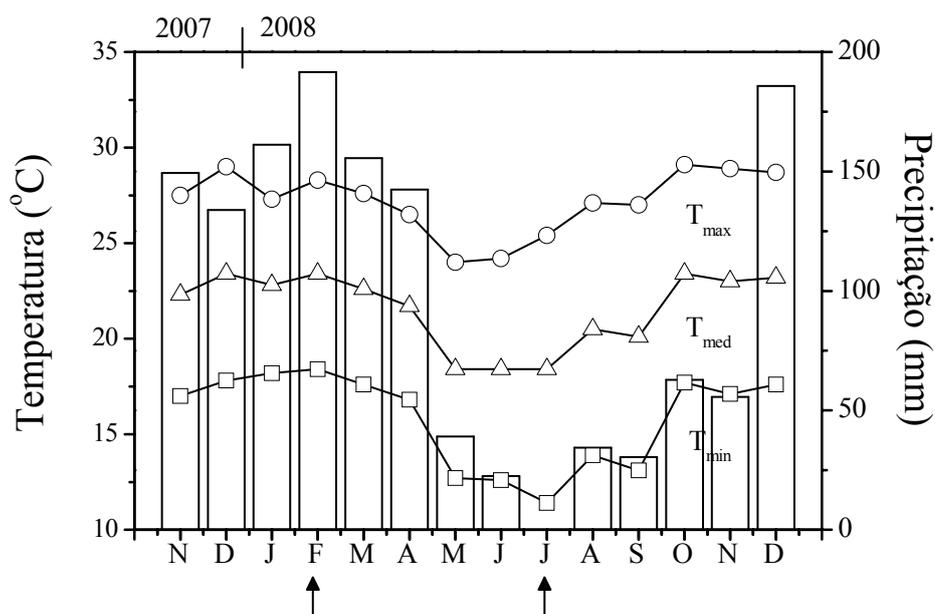


Figura 1.1 - Valores médios mensais das temperaturas (símbolos) máxima (T_{max}), média (T_{med}) e mínima (T_{min}), e precipitação total mensal (colunas) de novembro de 2007 a julho de 2008. As coletas das folhas foram realizadas em fevereiro e julho de 2008 (indicadas pelas setas).

Espécies receptoras

Como espécies receptoras foram utilizados diásporos de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) var. Regina (alface) e *Allium cepa* L. (Liliaceae) var. Baia Periforme (cebola) e sementes de *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) var. IPA 6 (tomate), espécies comerciais com germinação acima de 90% e pureza acima de 99%, confirmadas em pré-teste.

Preparação dos extratos

Os extratos foliares foram preparados segundo Souza *et al.* (2010) e utilizados nos bioensaios de germinação e comprimento inicial das espécies receptoras. Os oito diferentes tipos de folhas das plantas doadoras (*R. ferruginea* adulta coletada em estação chuvosa, *R. ferruginea* adulta coletada em estação seca, *R. ferruginea* jovem coletada em estação chuvosa, *R. ferruginea* jovem coletada em estação seca, *R. umbellata* adulta coletada em estação chuvosa, *R. umbellata* adulta coletada em estação seca, *R. umbellata* jovem coletada em estação chuvosa e *R. umbellata* jovem coletada em estação seca) foram secos em estufa (72 h, sob temperatura de 40 °C), moídos em moinho tipo Willey (Mesh 14) até virar pó e empacotados em embalagens plásticas. Os extratos foram preparados com a mistura do pó das

folhas com água destilada, a 10 ou 5% de massa/volume (g/mL). Essa mistura permaneceu durante 12 h em refrigerador na temperatura de aproximadamente 4 °C (Gatti et al. 2004). Após este período, os extratos foram filtrados em um funil de Buckner forrado com papel de filtro. Este funil estava acoplado a um Kitasato conectado a bomba de vácuo. Os efeitos dos extratos foliares foram comparados com o da água destilada, considerada como grupo controle.

Bioensaios de germinação

Os bioensaios de germinação foram realizados segundo Gatti *et al.* (2004), utilizando 5 mL dos extratos foliares à 10 ou 5% e água destilada (controle) para umedecer duas folhas de papel de filtro que forravam o fundo de placas de Petri esterilizadas. Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 20 diásporos ou sementes das espécies receptoras por placa de Petri, mantidos em câmaras de germinação (B.O.D.) com fotoperíodo de 12 horas sob temperaturas ótimas para cada espécie (20 °C para cebola e 24 °C para alface e tomate), confirmadas em pré-teste. As contagens dos diásporos ou das sementes germinadas foram realizadas em intervalos de 24 horas (Ferreira e Aquila, 2000). Foram considerados germinados aqueles que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (Ranal & Santana 2006). Utilizando-se destas contagens foi possível calcular porcentagem, tempo médio e entropia informacional da germinação (Ranal & Santana 2006).

Bioensaios de comprimento inicial das espécies receptoras

Os bioensaios de comprimento inicial foram conduzidos com quatro repetições de dez diásporos ou sementes pré-germinadas das espécies receptoras em água destilada (com radícula entre 2 e 4 mm) por caixa plástica, mantidas em câmaras com fotoperíodo de 12 horas sob temperatura ótima para cada espécie receptora (20 °C para cebola e 24 °C para alface e tomate), confirmadas em pré-teste. As caixas estavam forradas com duas folhas papel filtro umedecidas com 20 mL dos extratos foliares à 10 ou 5% e água destilada (controle) (Gatti *et al.* 2004). As medidas de comprimento inicial foram realizadas após cinco dias da incubação. A parte aérea (PA) e parte radicular das plântulas (PR) (mm) foram consideradas como a distância do colo até o ápice meristemático do caule e do colo até o ápice meristemático da raiz principal, respectivamente (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2009).

Características físico-químicas dos extratos

O pH de cada extrato foliar foi medido usando um pHmetro. Os valores obtidos em todos os extratos variaram de 5,02 a 5,90, dentro do limite tolerado pela maioria das plantas vasculares (Larcher 2000) e assim, foram dispensados bioensaios para avaliação da influência de pH dos extratos sobre as espécies receptoras. O potencial osmótico (PO, mOsm/kg) foi medido em osmômetro automático (μ Osmotte, modelo 5004), utilizando-se 50 μ L de cada extrato à temperatura de 25°C. Os valores de PO foram transformados em pressão osmótica pela conversão de mOsm/kg para MPa (Larcher 2000). O efeito do potencial osmótico foi testado sobre a porcentagem, tempo médio e entropia informacional de germinação e sobre o comprimento inicial de alface, cebola e tomate, utilizando-se soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) nas concentrações: -1, -2 e -3 MPa em relação ao controle (água destilada).

Análise Estatística

O delineamento dos experimentos em laboratório foi inteiramente casualizado. Além do grupo controle, foram utilizados oito tratamentos (extratos foliares aquosos de *R. ferruginea* adulta coletada em estação chuvosa, *R. ferruginea* adulta coletada em estação seca, *R. ferruginea* jovem coletada em estação chuvosa, *R. ferruginea* jovem coletada em estação seca, *R. umbellata* adulta coletada em estação chuvosa, *R. umbellata* adulta coletada em estação seca, *R. umbellata* jovem coletada em estação chuvosa e *R. umbellata* jovem coletada em estação seca) divididos em dois níveis de tratamento (duas concentrações: 10 e 5%). O número de repetições no grupo controle e nos tratamentos foi igual a quatro.

Testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software livre Bioestat 5.0. (Sociedade Civil de Mamirauá 2007). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Lilliefors. Diferenças significativas entre as médias com o uso de água destilada (controle) e dos extratos foliares aquosos foram testadas par-a-par usando-se Mann-Whitney (quando as médias não eram normais) ou por teste T (quando as médias eram normais), com nível de decisão (α) em $p < 0,05$ (Zar, 2010).

Análises de componentes principais (ACP) (Jongman *et al.* 1995) foram realizadas para avaliar simultaneamente a influência de todas as variáveis estudadas nos extratos foliares aquosos. Para tanto, os dados foram centralizados e padronizados utilizando o software MVSP (Kovach, 1999). A ACP é uma análise de vetores em uma matriz de correlação ou de covariância calculada sobre uma matriz de dados originais.

RESULTADOS

Os valores de pH dos extratos a 10 e a 5% estiveram entre 5,02 a 5,90 (Tabela 1.1). Os valores de potencial osmótico (PO) dos extratos a 10% estiveram ao redor de -2 MPa, exceto no extrato das folhas de *R. umbellata* jovem coletadas em estação seca, que apresentou PO igual a -2,67 (Tabela 1.1). Os valores de PO dos extratos a 5% estiveram entre -1 e -1,42 MPa, respectivamente (Tabela 1.1). Não houve efeito do PO de PEG entre -1 e -2 MPa sobre a porcentagem, tempo médio e entropia informacional de germinação de alface, cebola e tomate.

Tabela 1.1 - Potenciais osmóticos (PO, MPa) e potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos foliares aquosos de indivíduos adultos e jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez e *Rapanea umbellata* Mart. (Primulaceae) coletados em estações chuvosa e seca, nas concentrações de 10 e 5%.

Extratos			PO		pH	
Espécie	Estágio	Estação	10%	5%	10%	5%
<i>R. ferruginea</i>	Adulto	Chuvosa	-2,10	-1,07	5,02	5,12
		Seca	-2,10	-1,10	5,41	5,60
	Jovem	Chuvosa	-2,17	-1,30	5,19	5,25
		Seca	-2,30	-1,15	5,36	5,45
<i>R. umbellata</i>	Adulto	Chuvosa	-1,92	-1,02	5,41	5,53
		Seca	-1,97	-1,00	5,13	5,23
	Jovem	Chuvosa	-1,72	-1,00	5,86	5,90
		Seca	-2,67	-1,42	5,57	5,81

Todos os extratos foliares a 10% resultaram porcentagens de germinação de alface significativamente ($p < 0,05$) menores que a do controle (Figura 1.2 A). A porcentagem de germinação de cebola foi significativamente menor que a do controle quando submetida aos extratos foliares de indivíduos adultos e jovens de *R. ferruginea* e de indivíduos jovens de *R. umbellata* provenientes de estação seca na concentração 10% (Figura 1.2 C). A porcentagem de germinação de tomate foi significativamente diferente do controle com o uso dos extratos a 10% de *R. ferruginea* e *R. umbellata* adultas e jovens provenientes de estação seca e em *R. umbellata* adulta de estação chuvosa (Figura 1.2 E).

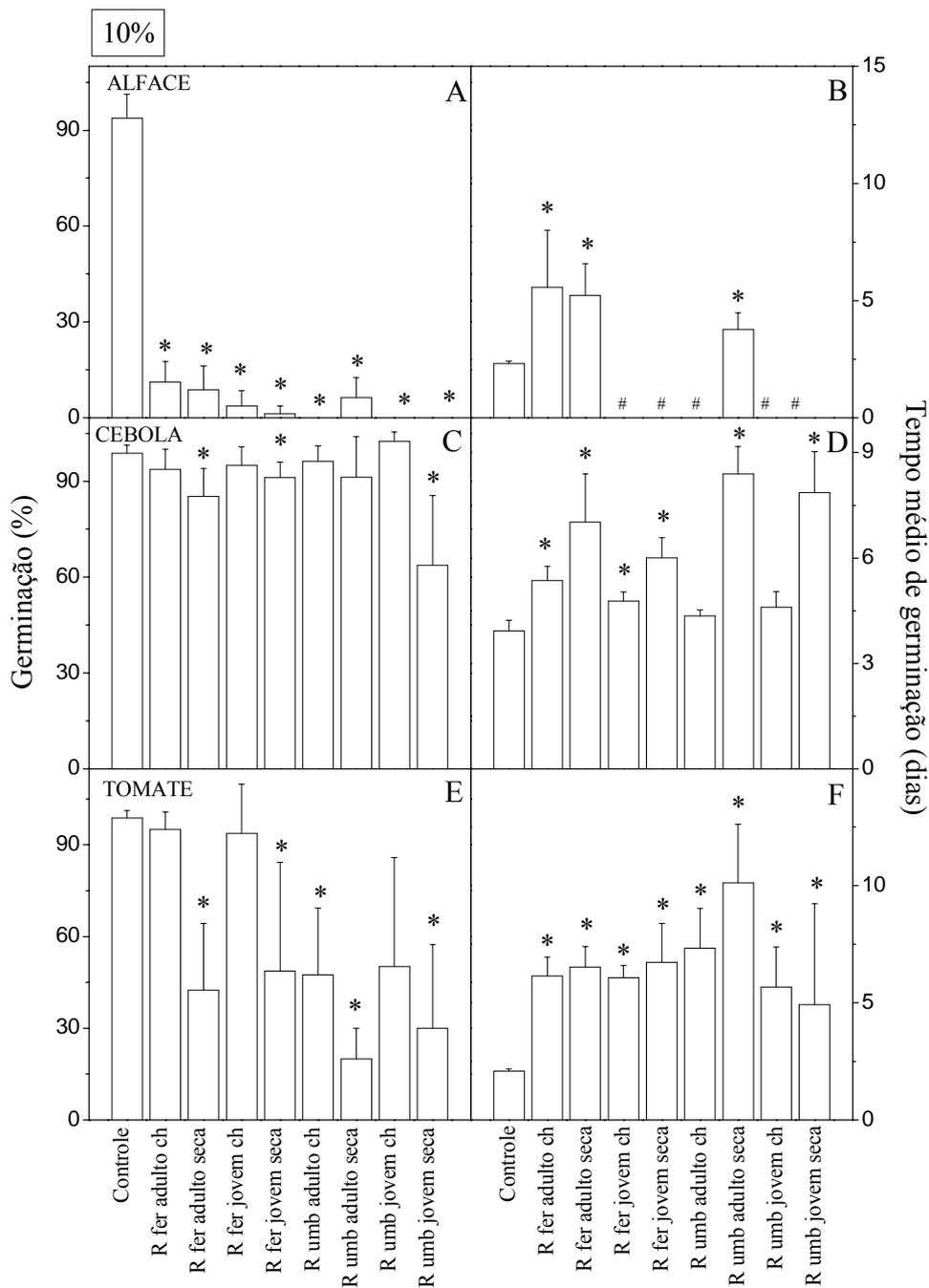


Figura 1.2 - Valores médios (colunas) e de porcentagem de germinação e tempo médio de germinação de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliares aquosos (10% m/v) de indivíduos adultos ou jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca. Asteriscos sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) da média do controle. Valores de tempo médio de germinação não foram apresentados (#) quando não houve germinação em algumas ou em nenhuma das réplicas nos tratamentos com os extratos.

Não foi possível calcular o tempo médio de germinação de alface quando não houve germinação em algumas ou em nenhuma das réplicas de alguns tratamentos com os extratos a 10% (Figura 1.2 B). A concentração 10% dos extratos foliares de *R. ferruginea* adulta obtidos em estação chuvosa e na seca condicionaram valores de tempo médio de germinação de alface significativamente maiores que do controle. Nesta concentração, o tempo médio de germinação de cebola foi significativamente maior que do controle quando os diásporos foram submetidos aos extratos foliares de *R. umbellata* provenientes de estação seca e a todos os extratos foliares de *R. ferruginea* (Figura 1.2 D). Todos os extratos foliares a 10% condicionaram aumento significativo dos valores de tempo médio de germinação de tomate em relação ao controle (Figura 1.2 F).

A porcentagem de germinação de alface foi significativamente menor que a do controle com o uso de todos os extratos foliares a 5% (Figura 1.3A). A porcentagem de germinação de cebola foi significativamente menor que a do controle quando submetida aos extratos foliares de *R. ferruginea* jovem proveniente de estação chuvosa e *R. umbellata* adulta e jovem de estação seca na concentração 5% (Figura 1.3 C). A porcentagem de germinação de tomate foi significativamente maior que a do controle com o uso de extratos foliares de *R. ferruginea* e de *R. umbellata* adultas e jovens obtidos em estação seca e de *R. umbellata* adulta em estação chuvosa (Figura 1.3 E).

Todos os extratos foliares a 5% proporcionaram tempo médio de germinação de alface significativamente maior que a do controle (Figura 1.3 B). O tempo médio de germinação de cebola foi significativamente maior que a do controle quando submetidas aos extratos foliares a 5% de *R. ferruginea* e *R. umbellata* adulta e jovem provenientes de estação seca (Figura 1.3 D). O tempo médio de germinação de tomate foi significativamente maior que a do controle com o uso de todos os extratos foliares (Figura 1.3 F).

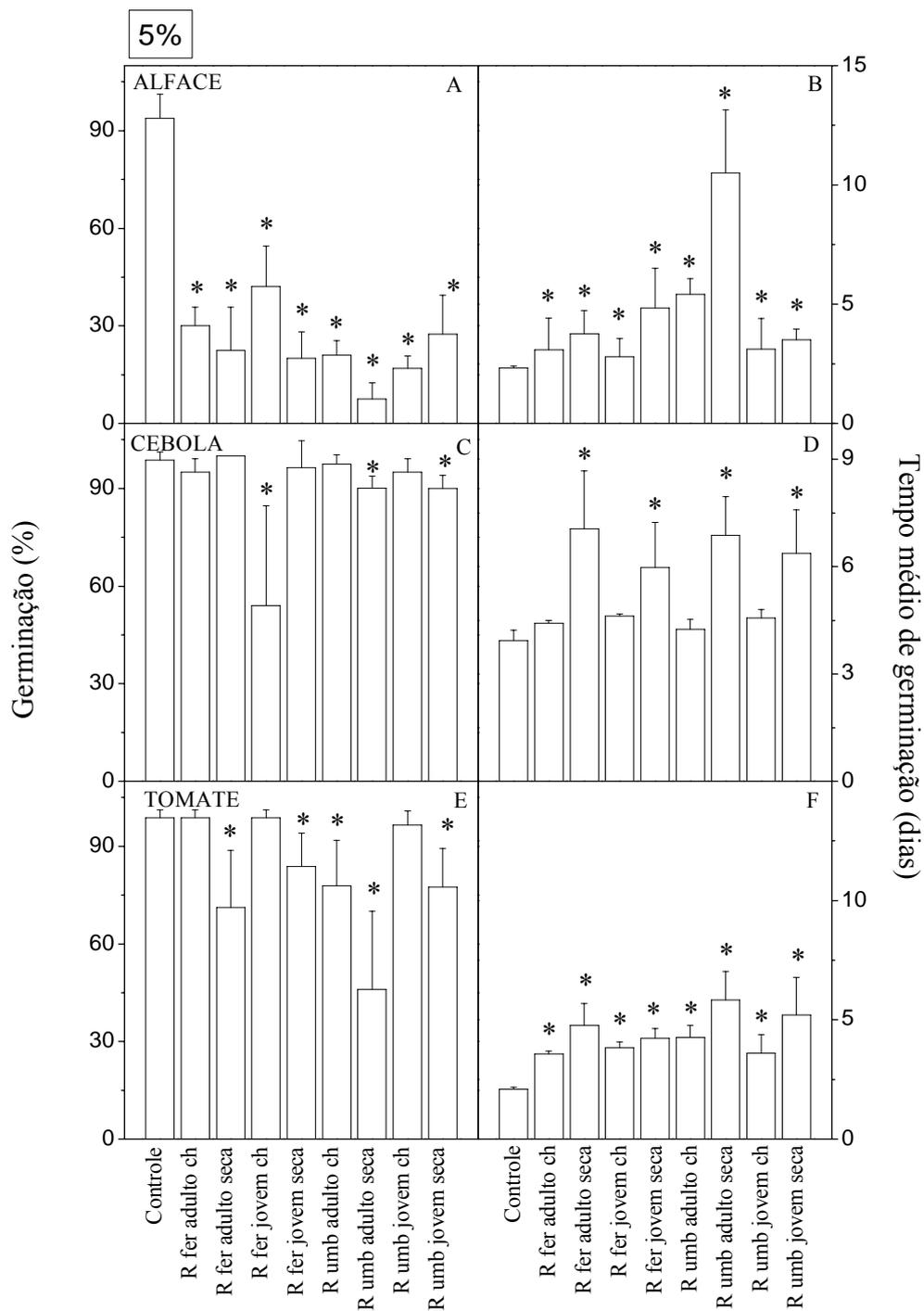


Figura 1.3 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de porcentagem de germinação e tempo médio de germinação de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliares aquosos (5% m/v) de indivíduos adultos ou jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca. Asteriscos sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) da média do controle.

Não foi possível calcular a entropia informacional de germinação de alface quando não houve germinação em algumas ou em nenhuma das réplicas de alguns tratamentos com os extratos a 10% (Figura 1.4 A). Todos os extratos, nos quais foi possível calcular a entropia informacional de germinação de alface, reduziram significativamente esses valores em relação ao controle (Figura 1.4 A). Os extratos a 5% de *R. ferruginea* jovem proveniente de estação chuvosa e *R. umbellata* adulta de estação seca proporcionaram entropia informacional de germinação de alface significativamente maior e menor, respectivamente, que a do controle (Figura 1.4 B). Todos os extratos originados de folhas coletadas em estação seca, tanto a 10 como a 5% de concentração, e o extrato de *R. ferruginea* adulta proveniente de estação chuvosa a 10% condicionaram valores de entropia informacional de germinação de cebola significativamente maiores que a do controle (Figura 1.4 C e D). A entropia informacional de germinação de tomate foi significativamente maior que a do grupo controle em todos os extratos foliares a 10 e 5% (Figura 1.4 E e F).

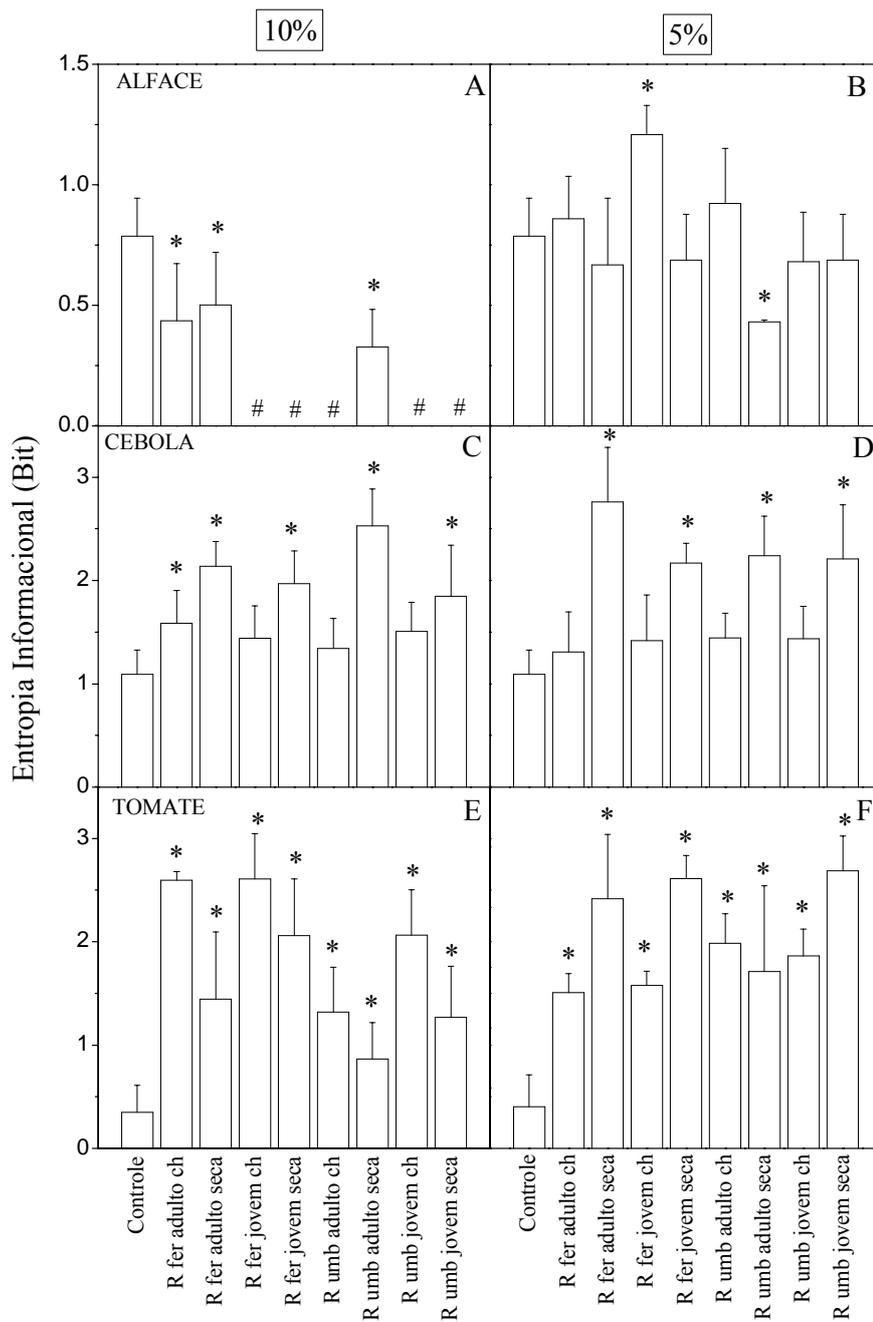


Figura 1.4 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) da entropia informacional de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou a extratos foliares aquosos (10 e 5% m/v) de indivíduos adultos ou jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca. Asteriscos sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) da média do controle. Valores de tempo médio de germinação não foram apresentados (#) quando não houve germinação em algumas ou em nenhuma das réplicas nos tratamentos com os extratos.

O comprimento da parte aérea (PA) das plântulas de alface foi significativamente menor que a do controle quando submetidas a todos os extratos foliares provenientes de estação chuvosa a 10% (Figura 1.5 A). Na concentração 5%, quase todos os extratos foliares condicionaram valores de PA significativamente menores que o controle, com exceção de *R. ferruginea* adulta proveniente de ambas estações (Figura 1.5 B). O comprimento da parte radicular (PR) das plântulas de alface foi significativamente menor que o controle com o uso de todos os extratos a 10 ou a 5% (Figura 1.5 A e B). Os valores de PA e PR das plântulas de cebola foram significativamente menores que os do controle quando submetidas a todos os extratos foliar aquosos a 10 e a 5% (Figura 1.5 C e D). Todos os extratos foliares a 10% condicionaram valores de PA e de PR de tomate significativamente menores que o controle (Figura 1.5 E). A maioria dos extratos a 5% proporcionaram valores de PA e de PR de tomate significativamente menores que o do grupo controle, com exceção de extrato preparado com indivíduos jovens de *R. ferruginea* proveniente de estação seca (Figura 1.5 F).

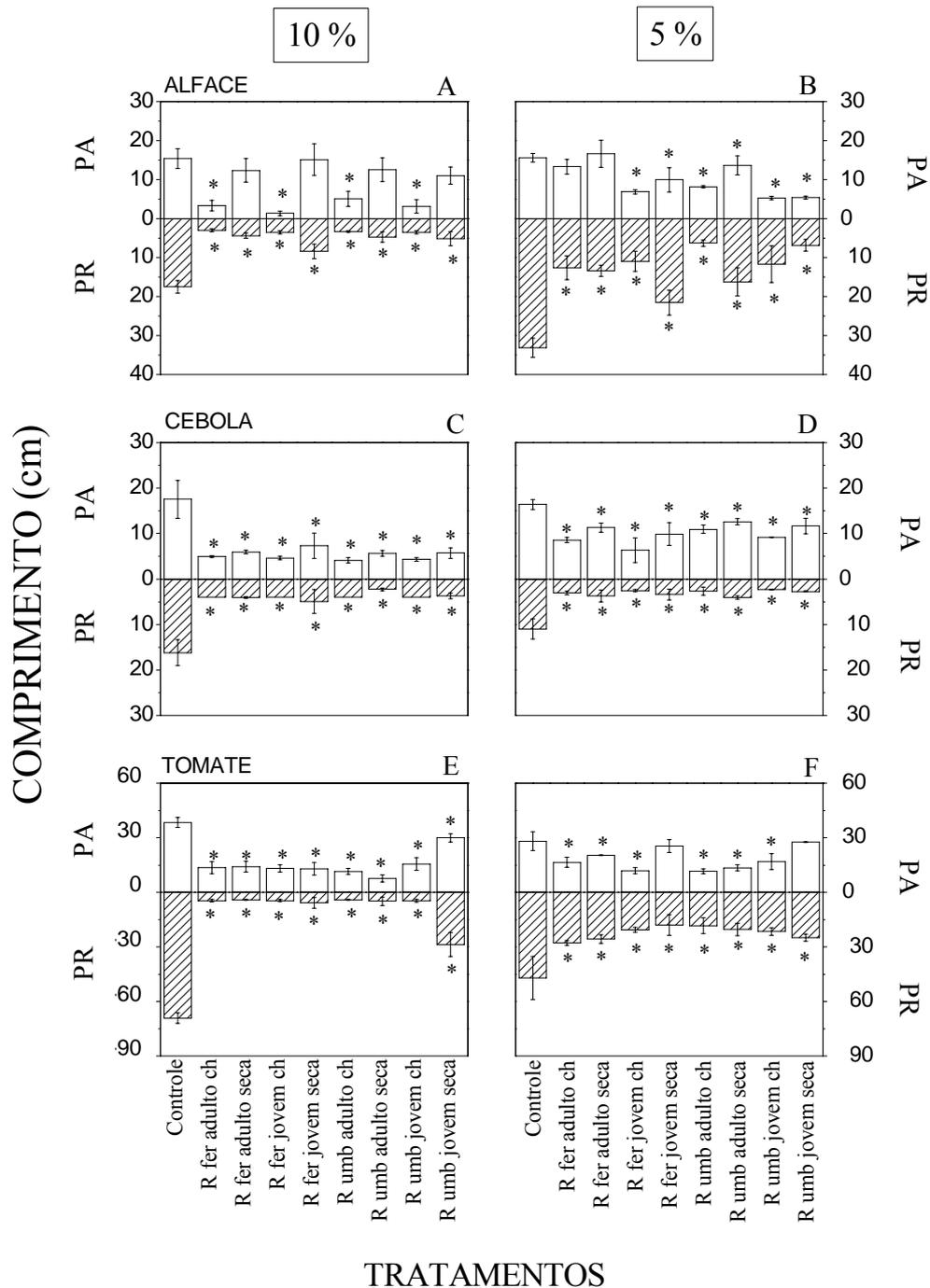


Figura 1.5 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de comprimento (mm) das partes aérea (PA) e radicular (PR) de plântulas de alface, cebola e tomate submetidas à água destilada (controle) ou aos extratos foliares aquosos (10 e 5% m/v) de indivíduos adultos ou jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. (R fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (ch) ou seca. Asteriscos sobre ou abaixo das colunas indicam médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) da média do controle.

As ACP demonstraram que os dados obtidos com o uso dos extratos provenientes de folhas de estação chuvosa e seca se separaram em quadrantes distintos, independentemente da espécie doadora ou receptora (Figuras 1.6, 1.7 e 1.8). A distribuição dos pontos relacionados à estação seca foi mais influenciada pelas variáveis: porcentagem, tempo médio e entropia informacional de germinação das espécies receptoras. Porém, a distribuição dos pontos relacionados aos extratos obtidos com material proveniente da estação chuvosa foi mais influenciada pelo comprimento inicial das plântulas receptoras.

Com relação à idade das espécies doadoras, apenas os indivíduos adultos e jovens de *R. umbellata* separaram-se em quadrantes diferentes quando utilizados extratos de folhas colhidas na estação seca sobre alface (Figura 1.6) e tomate (Figura 1.8) e nos obtidos das folhas coletadas na estação chuvosa sobre tomate. Isto ocorreu porque, nestes casos, os pontos relacionados aos dados obtidos para plantas adultas estiveram mais influenciados pelo tempo médio e entropia informacional de germinação e, os pontos relacionados aos registros com plantas jovens, pela porcentagem de germinação.

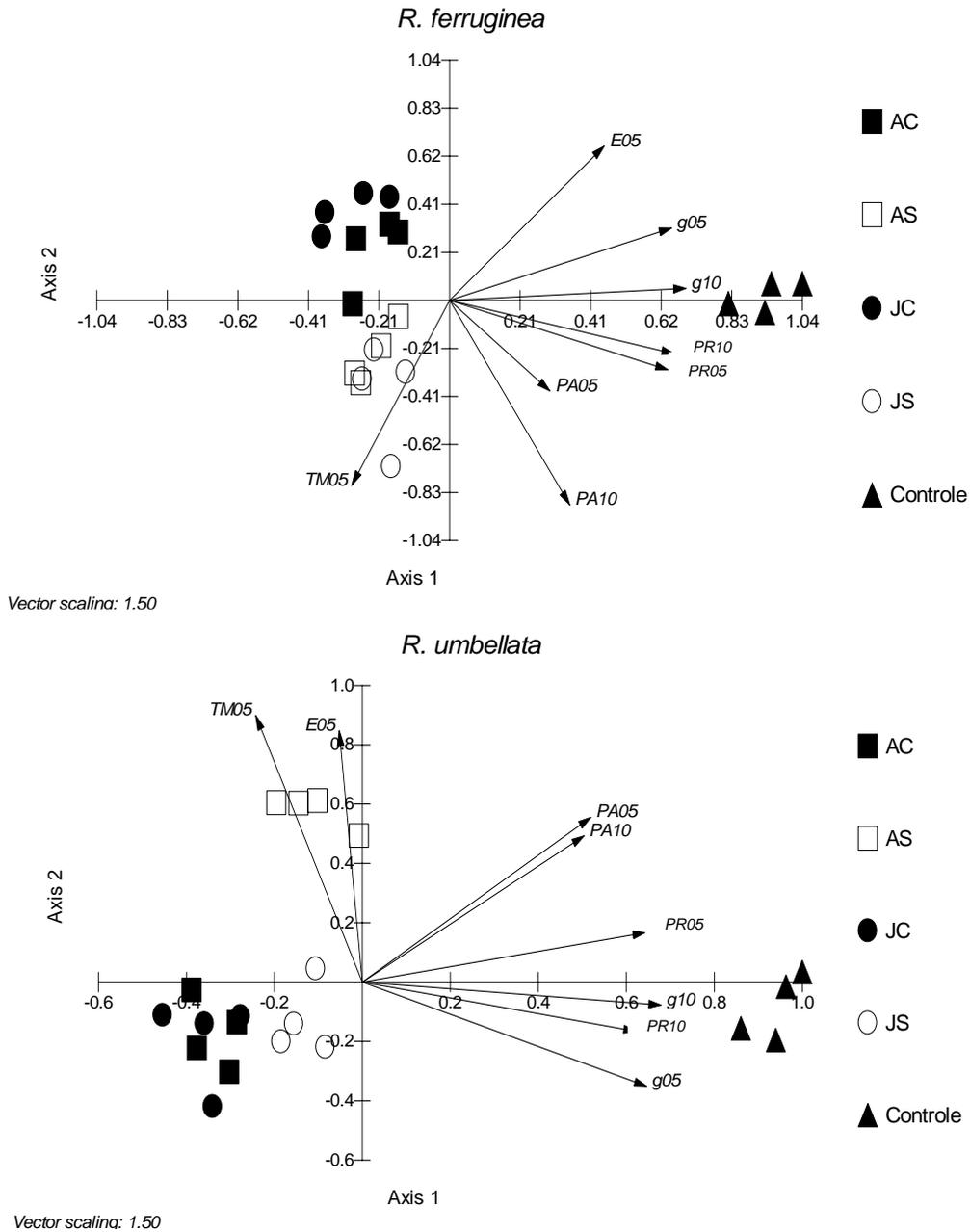


Figura 1.6 – Análise dos componentes principais (ACP) que determinam a atividade de extratos foliares aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre diásporos de alface. Os vetores representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional (E) de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de alface sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05). Na ACP de *R. ferruginea*, o primeiro e o segundo eixos explicam 55,49% e 24,28% da variação, respectivamente. Na ACP de *R. umbellata*, o primeiro e o segundo eixos explicam 58,29% e 23,65% da variação, respectivamente.

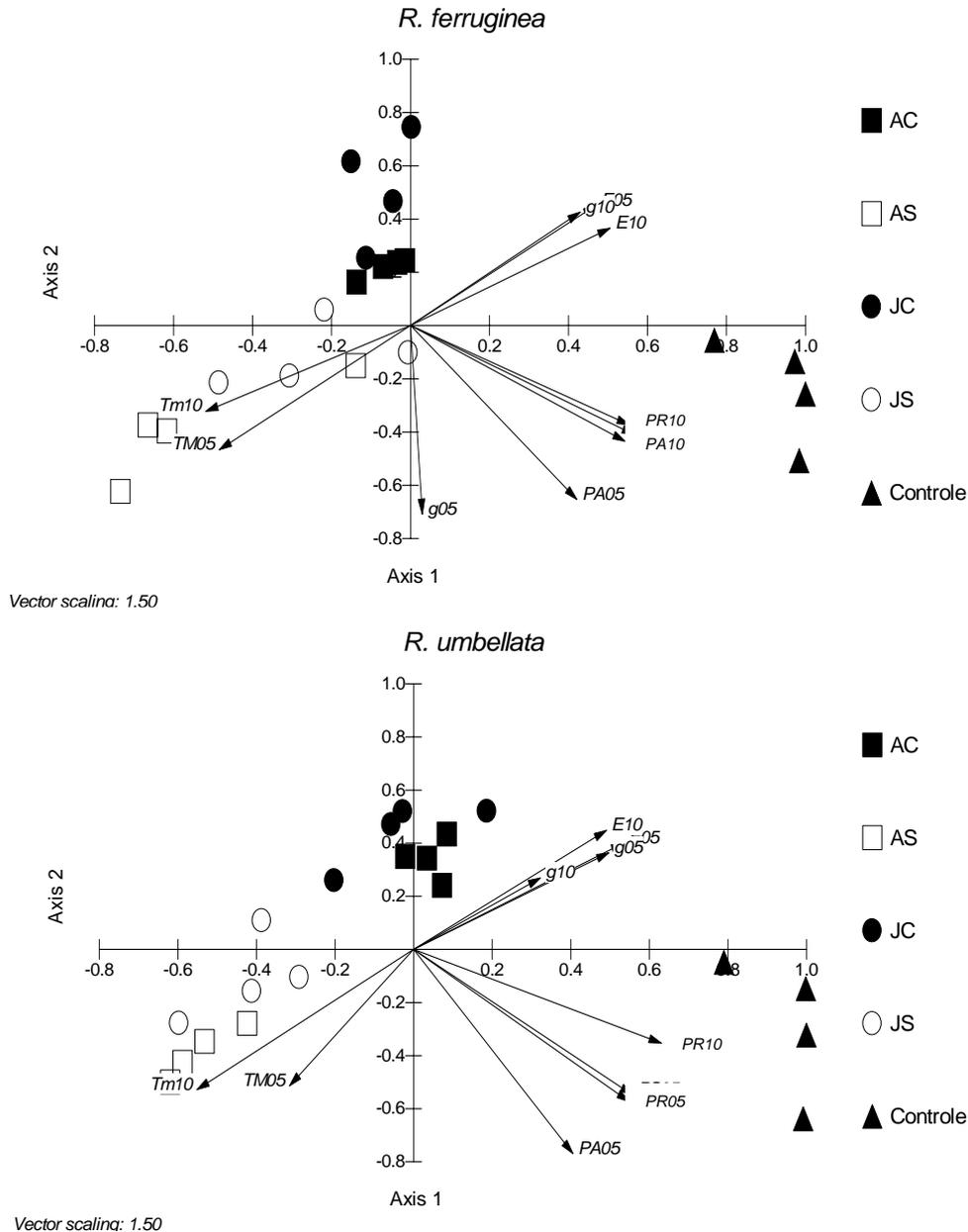


Figura 1.7 – Análise dos componentes principais que determinam a atividade de extratos foliares aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre diásporos de cebola. São apresentados vetores que representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de cebola sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05). Na ACP de *R. ferruginea*, o primeiro e o segundo eixos explicam 52,92% e 25,38% da variação, respectivamente. Na ACP de *R. umbellata*, o primeiro e o segundo eixos explicam 51,76% e 23,87% da variação, respectivamente.

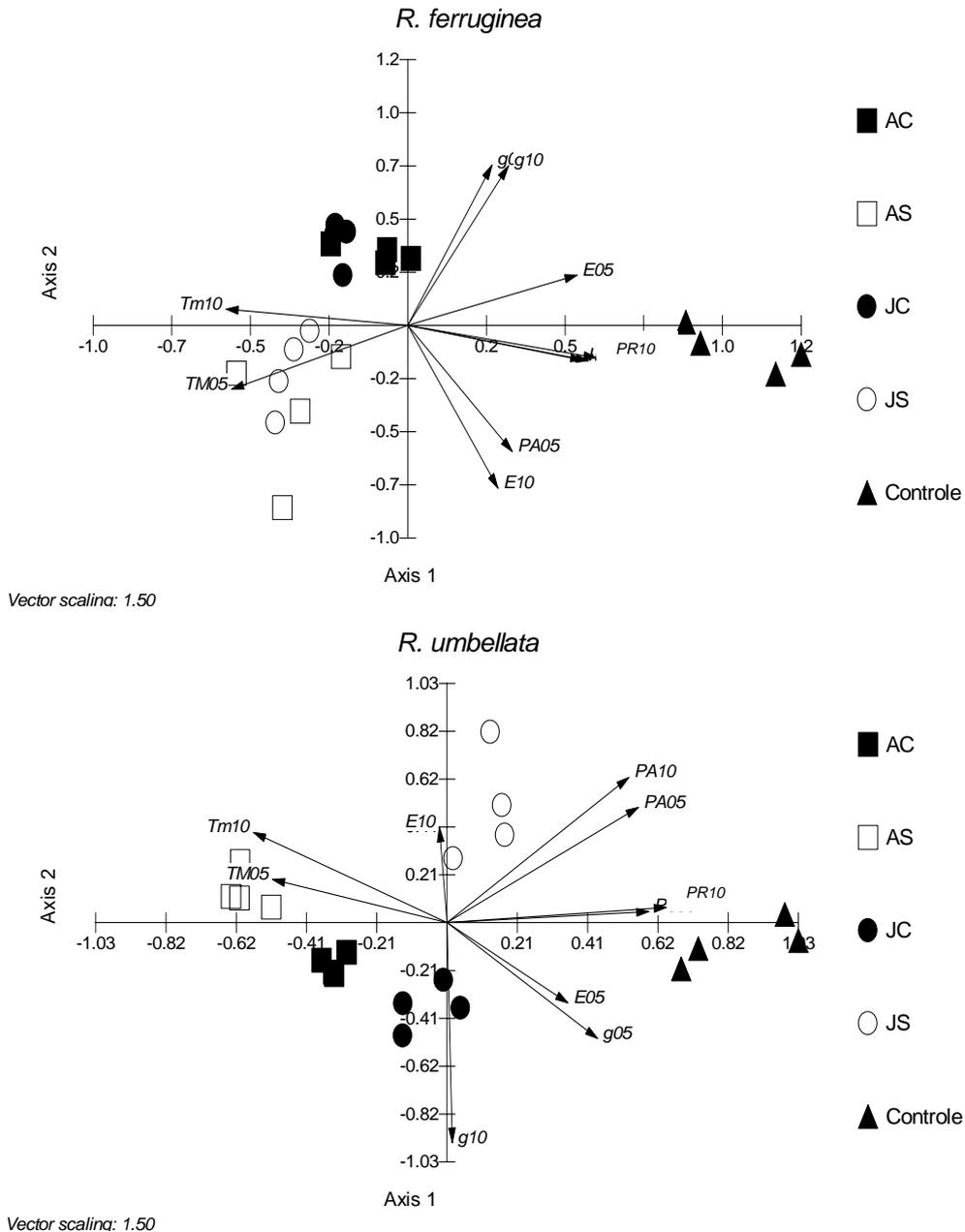


Figura 1.8 – Análise dos componentes principais que determinam a atividade de extratos foliares aquosos de indivíduos adultos (A) e jovens (J) de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez (R. fer) e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (R. umb) (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa (C) e seca (S) sobre sementes de tomate. São apresentados vetores que representam a porcentagem (g), o tempo médio (TM) e a entropia informacional de germinação e o crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de tomate sob os extratos foliar aquosos nas concentrações 10% (10) e 5% (05). Na ACP de *R. ferruginea*, o primeiro e o segundo eixos explicam 58,85% e 24,03% da variação, respectivamente. Na ACP de *R. umbellata*, o primeiro e o segundo eixos explicam 49,70% e 19,80% da variação, respectivamente.

Os extratos de *R. umbellata* e de *R. ferruginea* provenientes de material coletado em estação seca condicionaram maiores frequências de atividade alelopática do que os de estação chuvosa (Tabela 1.2). Entre os extratos de folhas coletadas em estação seca, aqueles provenientes de *R. umbellata* proporcionaram maiores frequências de atividade alelopática que os de *R. ferruginea*. A separação de plantas adultas e jovens de *R. umbellata* em quadrantes diferentes nas ACP (Figura 1.6 e 1.8) foi confirmada pelos valores de frequência de atividade alelopática, já que os extratos foliares de plantas adultas condicionaram maiores valores do que as plantas jovens quando provenientes da mesma estação climática (Tabela 1.2). Apesar de não haver separação aparente entre plantas adultas e jovens de *R. ferruginea* nas ACP, a frequência de atividade alelopática foi maior em extratos foliares de plantas jovens provenientes da mesma estação (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Ordem decrescente no total de freqüência de atividade alelopática dos extratos foliares aquosos (10 e 5% m/v) de indivíduos adultos ou jovens de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. e *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) provenientes de coletas em estação chuvosa e seca. Presença (1), ausência (0) e total de freqüência de atividade alelopática dos extratos sobre parâmetros da germinação (porcentagem, tempo médio e entropia informacional) e do comprimento inicial (parte aérea e radicular) de alface (A), cebola (C) e tomate (T).

	Germinação												Comprimento								Freqüência total							
	Germinação						Tempo médio						PA				PR											
	10%			5%			10%			5%			10%		5%		10%		5%									
	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C		T	A	C	T			
<i>R. umbellata</i> adulta seca	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28
<i>R. umbellata</i> jovem seca	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	27
<i>R. ferruginea</i> jovem seca	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	26
<i>R. ferruginea</i> adulta seca	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	26
<i>R. ferruginea</i> jovem ch	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24
<i>R. umbellata</i> adulta ch	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23
<i>R. ferruginea</i> adulta ch	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	22
<i>R. umbellata</i> jovem ch	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21

DISCUSSÃO

De modo geral, foi observada redução da porcentagem de germinação, aumento do tempo médio e entropia informacional da germinação e, por outro lado, redução do comprimento de PA e de PR de plântulas de alface, cebola e tomate com o uso de extratos a 10% e 5%.

A maior diferença na atividade alelopática dos extratos de *R. ferruginea* e *R. umbellata* foi produzida pela sazonalidade. Diferentes metabólitos secundários com ação alelopática podem ser produzidos a partir de alterações sazonais e estes podem agir em diferentes fases das espécies receptoras (Einhellig 1996). Folhas colhidas durante a estação seca condicionaram extratos com maior atividade alelopática sobre variáveis germinativas, enquanto as colhidas na estação chuvosa produziram extratos mais ativos sobre variáveis relacionadas ao crescimento inicial das plântulas receptoras.

O material coletado durante a estação seca condicionou ainda maior frequência de atividade alelopática e alguns resultados que se destacaram dos demais, como o tempo médio de germinação de diásporos de alface submetido ao extrato foliar aquoso de *R. umbellata* adulta. Estes resultados são diferentes dos encontrados para plantas do continente Europeu, onde a estação chuvosa (inverno) de ambientes mediterrâneos propiciou maiores concentrações de metabólitos secundários em várias espécies (Llusià & Pañuelas 2000; Palá-Paúl *et al.* 2001; Llusià *et al.* 2010). Assim como as savanas, ambientes mediterrâneos são caracterizados por clima estacional, com verão marcado por altos valores de temperatura, radiação e déficit hídrico.

Os fatores ambientais presentes em condições de sazonalidade podem agir simultaneamente ou separadamente sobre o metabolismo secundário (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). A concentração de monoterpenos voláteis nas folhas de *Santolina rosmarinifolia* L., por exemplo, apresentou correlação significativamente negativa com a temperatura e positiva com a precipitação (Palá-Paúl *et al.* 2001). Llusià *et al.* (2006) testaram isoladamente os efeitos da seca e do aumento da temperatura sobre terpenos voláteis de plantas nativas da região da Cataluña (Espanha) e observaram que o conteúdo destes terpenos aumentou em solos com seca moderada e diminuiu em temperaturas elevadas. Eles descreveram que as plantas tendem a acumular carbono sob estresse hídrico moderado porque há restrição do crescimento pela limitação hídrica e esse carbono pode ser alocado em compostos como celulose e lignina que tornam as plantas lenhosas, de estoque como carboidratos, ou de defesa como os taninos.

Segundo Llusia & Pañuelas (2000) e Llusia *et al.* (2010), as variações sazonais nos conteúdos de terpenos das espécies estudadas em clima mediterrâneo podem estar ligadas as alterações correspondentes na temperatura do ar, na radiação, disponibilidade hídrica, mas também no estágio de desenvolvimento e atividade da planta. As variações no conteúdo ou proporções de metabólitos secundários em plantas podem estar relacionadas ao maior desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos nas plantas no período de crescimento (verão), o que pode levar a uma menor concentração de metabólitos secundários por diluição devido ao aumento da biomassa (Llusia & Pañuelas 2000, Izhaki 2002, Gobbo-Neto & Lopes 2007). Assim, as semelhanças encontradas entre o presente trabalho e os realizados em plantas mediterrâneas indicam que déficit hídrico e temperaturas moderadas, menor fotoperíodo e utilização reduzida de energia no crescimento vegetativo das plantas no período seco do cerrado são fatores determinantes de maior atividade alelopática nessa época.

A idade das plantas foi um fator que influenciou diferentemente o potencial alelopático de extratos foliares das duas espécies estudadas, uma vez que maiores valores de frequência de atividade alelopática ocorreram em plantas adultas de *R. umbellata* e em plantas jovens de *R. ferruginea* quando os extratos foram provenientes de mesma estação. A idade das plantas pode influenciar sua produção de metabólitos secundários de modo diferenciado, não podendo ser feitas generalizações. O maior conteúdo de metabólitos secundários observado em folhas jovens por muitos autores (Coley 1983, Langenhein *et al.* 1986, Marchi *et al.*, 2008) também não pode ser aplicado para as plantas jovens.

Concluimos que os extratos aquosos de folhas de *R. umbellata* e *R. ferruginea* apresentaram atividade alelopática. O fator que mais afetou a atividade alelopática das duas espécies estudadas de *Rapanea* foi a sazonalidade. A estação seca potencializou os efeitos dos extratos foliares, com maior frequência de atividade alelopática que a estação chuvosa nas duas espécies. A idade das plantas foi um fator que influenciou diferentemente as espécies estudadas, sendo que maiores valores de frequência de atividade alelopática foram observados em folhas de plantas adultas de *R. umbellata* e de plantas jovens de *R. ferruginea* provenientes de mesma estação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blanco, J.A. 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling** **209**: 65-77.
- Chou, C.H. 1986. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. Pp. 57-73. In: Putnam, A.R. & Tang, C.S (ed.). **The science of allelopathy**. New York. John Wiley & Sons.
- Coley, P.D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. **Ecological monographs** **53**: 209-233.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defenses. **Science** **230**: 895 – 899.
- Damascos, M.A., Prado, C.H.B.A. & Ronquim, C.C. 2005. Bud composition, branching patterns and leaf phenology in cerrado woody species. **Annals of Botany** **96**: 1075-1084.
- Duke, S.O. & Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal** **88**: 886-893.
- Einhellig, F.A. 2004. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente de ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal** **12**: 175-204.
- Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S., 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no comprimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica** **18**: 459-472
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** **30**: 374-381.
- Haridasan, M. 2001. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. Pp.68-83. In: McClain, M.E., Victoria, R.L & Richey, J.E. (ed). **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. New York. Oxford University Press.

- Izhaki, I. 2002. Emodin - a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist** **155**: 205 – 217.
- Jongman R.H.G., Braak C.J.F & van Tongeren O.F.R. 1995. **Data analysis in community and landscape ecology**. Cambridge. Cambridge University Press.
- Klink, C.A. & Machado, R.B. 2005. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology** **19**: 707-713.
- Kovach. 1999. **Multivariate Statistical Package**. Anglesey. Kovach Computing Services.
- Langenheim, J.H., Macedo, C.A. & Stubblebine, W.H. 1986. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, **14**: 51-59
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos. Rima Artes e Textos.
- Lorandi, R., Castro, D.M. & Feres, R. 1999. Carta Pedológica das Áreas Urbana e Suburbana de São Carlos (SP). **Revista Brasileira de Cartografia** **51**: 9-15.
- Llusià, J. & Peñuelas, J. 2000. Seasonal Patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. **American Journal of Botany** **87**: 133- 140.
- Llusià, J., Pañuelas, J., Alessio, G.A. & Estiarte, M. 2006 Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. **Physiologia Plantarum**, **127**: 632-649.
- Llusià, J. Peñuelas, J. & Ogaya, R. 2010. Annual and seasonal changes in foliar terpene content and emission rates in *Cistus Albidus* L. submitted to soil drought in Prades (Catalonia, NE Spain). **Acta Physiologiae Plantarum** **32**: 387-394.
- Mallik, U.A. 2008. Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. Pp. 25-38. In. Zeng, R. S., Mallik, A. U. & Luo, S. M. (Ed). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. New York. Springer Science + Business Midia.
- Marchi, G., Marchi, E.C.S. Wang, G. & Mcgiffen, M. 2008. Effect of age of a sorgum-sundgrass hybrid on its allelopathic action. **Planta Daninha** **26**: 707-716.
- Mauseth, J. 1988. Secretory Cells and Tissues. Pp. 141-166. In: **Plant Anatomy**. Menlo Park. Benjamin Cummings.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília.

- Oliveira, S.C. 2010. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Palá-Pául, J., Pérez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Pala-Paúl, R. Sanz, J., Conejero, Fco. 2001. Seasonal variations in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology** **29**: 663-672.
- Paneitz, A., Westendorf, J. 1999. Anthroid contents of rhubarb (*Rheum undulatum* L.) and other *Rheum* species and their toxicological relevance. **European Food Research and Technology** **210**: 97-101.
- Pinheiro, A.L. & Carmo, A.P.T. 1993. Contribuição ao estudo tecnológico da canela-azeitona, *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez, uma espécie pioneira. I. Características anatômicas da madeira. **Ciência Florestal** **3**: 121-145.
- Ranal, M.A. & Santana, D.G., 2006. How and why to measure the germination process. **Revista Brasileira de Botânica** **29**: 1-11.
- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. New York, Academic Press.
- Tolentino, M. 1967. **Estudo crítico do clima de São Carlos**. Prefeitura municipal de São Carlos. 78 pp.
- Silva, G.B., Martins, L., DaSilva, C.L., Young, M.C.M., Ladeira, A.M. 2006. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Hoehnea* **33**: 331- 338.
- Sociedade Civil de Mamirauá. 2007. **Bioestat: Aplicações estatísticas na área de biociências**. Belém. Sociedade Civil de Mamirauá.
- Souza, F.M., Gandolfi, S., Perez, S.C.J.G.A, Rodrigues, R.R. 2010. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta botanica brasílica** **24**: 169-174.
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S. & Giulietti, A.M. 2005. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Carlos. Rima Editora.
- Zar, J.H. 2010. **Biostatistical analysis**. New Jersey. Prendice Hall.

CAPÍTULO 2

Efeitos alelopáticos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) sobre plantas infestantes de culturas agrícolas

RESUMO

(Efeitos alelopáticos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) sobre plantas infestantes de culturas agrícolas). Substâncias alelopáticas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de produtos alternativos baseados em compostos naturais para o controle de espécies infestantes. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito do extrato aquoso de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) com a ação de um herbicida sintético sobre variáveis germinativas e de crescimento inicial de espécies infestantes das culturas agrícolas. As espécies infestantes estudadas foram: capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae). Os efeitos do extrato foliar aquoso de *R. umbellata* nas concentrações 10 e 5% (massa de pó de folhas por volume de água destilada, g/mL) foram comparados com os da água destilada (controle) e do herbicida sintético oxifluorfem. O extrato foliar e o herbicida não tiveram efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a porcentagem de germinação das espécies infestantes. O tempo médio de germinação de capim-arroz e corda-de-viola foi significativamente menor ($p < 0,05$) no controle do que quando foram utilizados o extrato foliar e o herbicida, sendo que o extrato foi significativamente mais inibitório que o herbicida sobre corda-de-viola. O comprimento inicial da parte aérea das espécies invasoras foi significativamente mais afetado pelo herbicida do que pelo extrato foliar. Porém, o comprimento inicial da parte radicular das espécies infestantes foi mais afetado pelo extrato foliar do que pelo herbicida. O extrato aquoso foliar de *R. umbellata* apresentou, portanto, resultados considerados promissores para ser utilizado em estudos de fracionamento e purificação de substâncias alelopáticas que possam ser empregadas como herbicidas de origem natural e biodegradáveis.

Palavras-Chave: Alelopatia, Crescimento inicial, Germinação, Oxifluorfem.

ABSTRACT

(Allelopathic effects of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) on weeds of crops.). Allelopathic substances can be used to the development of alternatives based in natural products to the control of infests species. The objective of the present study was to compare the allelopathic activity of aqueous leaf extracts of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) with the action of a synthetic herbicide over germination and initial length of weed species of agricultural cultures. The weed species used were: barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae), wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae) and morning-glory (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae). The effects of the aqueous leaf extract of *R. umbellata* under concentration 10 and 5% (leaf dry weight per distilled water volume, g/mL) were compared to distilled water (control) and to the synthetic herbicide oxyfluorfen. The leaf extract and the herbicide did not have significant ($p > 0.05$) effect over weed species germination percentage. Barnyard grass and morning-glory germination average time was significant lower ($p < 0.05$) in control than extract and herbicide treatments. The extract was significantly more active than the herbicide over morning-glory in both variables. The initial length of the aerial part of weed species was significantly more affected by the herbicide than the extract. The initial length of the subterraneous part of infest species was significantly more affected by leaf extract than by the herbicide. Therefore, the

leaf aqueous extract of *R. umbellata* showed promising results to fractionat and purify active substances that could be employed as herbicides of natural origin and biodegradables.

Key-Words: Allelopathy, Germination, Initial length, Oxyfluorfen.

INTRODUÇÃO

O manejo de plantas infestantes tem sido um problema desde o começo da agricultura. De modo geral, as plantas infestantes possuem maior área específica foliar e são mais competitivas que as demais espécies, pois são melhores colonizadoras, se reproduzem mais rapidamente e sobrevivem em condições mais adversas (Hamilton *et al.* 2005; Colautti *et al.* 2006). Além disso, na grande maioria das vezes são plantas anuais a bianuais, de porte pequeno e são mais tóxicas à herbívoros (Sutherland 2004). Aumentos consideráveis na distribuição e na abundância de plantas infestantes podem ocorrer devido à falta de regulação por predadores naturais, patógenos e competidores (Callaway *et al.* 1999), situação presente em monoculturas, como as de soja, cana e arroz.

Convencionalmente, diversos tipos de herbicidas sintéticos são utilizados para o controle das espécies infestantes. Os herbicidas sintéticos são altamente eficazes em pequenas doses, apresentam boa seletividade para culturas e são relativamente baratos para a fabricação (Dayan *et al.* 2009). Em 2008, o Brasil passou a ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e responder pelo uso de 84% destes produtos em toda a América Latina (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2010). O uso indiscriminado e muitas vezes equivocado destes compostos contra plantas infestantes tem intoxicado as populações humanas e contaminado as comunidades biológicas (Peres & Moreira, 2007).

Em adição, as plantas infestantes desenvolveram sistemas de resistência aos herbicidas sintéticos convencionais (Duke *et al.* 2000). Algumas destas resistências têm justamente origem no uso indevido destes compostos (Preston 2005). Assim, a busca por herbicidas naturais, que sejam biodegradáveis e não produzam as contaminações provocadas pelos herbicidas sintéticos, é de fundamental importância (Souza Filho *et al.* 2006). Além disso, o consumo de produtos oriundos da chamada agricultura orgânica, que não permite o uso de herbicidas sintéticos, têm crescido mundialmente (Dayan *et al.* 2009).

A alelopatia é considerada como um fenômeno entre espécies doadoras e receptoras, onde plantas, algas, bactérias ou fungos podem liberar substâncias químicas (aleloquímicos)

no ambiente, influenciando o crescimento e o desenvolvimento dos sistemas biológicos (Rice 1984; Mallik 2008). A influência negativa da alelopatia de algumas plantas sobre outras tem sido descrita principalmente em culturas agrícolas (Macías *et al.* 2001, Mallik 2008). Os efeitos alelopáticos de muitas espécies têm sido estudados para o controle de plantas infestantes de culturas agrícolas (Vyvyan 2002; França *et al.* 2007). Nestes casos, os aleloquímicos que forem identificados podem ser usados como um recurso ao desenvolvimento de novos herbicidas naturais (Bagchi *et al.* 1997; Macías *et al.* 2001; Macías *et al.* 2008). Ácido acético, eugenol, ácido oléico, ácido pelargônico (Cropping & Duke 2007), triquetonas, cimetilina, bialafos e glufosinato (Duke *et al.* 2000), sorgoleona (Einhellig & Souza 1992), arteter (Bagchi *et al.* 1997) e helianonole (Nishiyama *et al.* 2005), por exemplo, são aleloquímicos já identificados com potencialidades de herbicidas.

As vantagens de herbicidas de origem aleloquímica estão em serem solúveis em água, ausência de moléculas halogenadas, rotas alternativas de ação, interações mais específicas com as plantas-alvo, atividade em menores concentrações e menor dano ambiental do que os herbicidas convencionais (Duke *et al.* 2000; Oliveros-Bastidas 2008; Macías *et al.* 2008). Os aleloquímicos podem agir no desenvolvimento das espécies receptoras através da interferência nos processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura dos estômatos, níveis de fitormônio, disponibilidade de mineral, e ainda, na divisão e alongamento celular, estrutura e a permeabilidade de membranas e paredes das células (Cruz-Ortega *et al.* 1998; Ferreira & Aquila 2000; Gniazdowska & Bogatek 2005).

Rapanea umbellata (Mart.) Mez (Primulaceae) é uma espécie que ocorre no Cerrado e quedas espécies com maior abundância e distribuição no Estado de São Paulo, Brasil (Wanderley *et al.* 2005). É uma espécie arbórea, heliófila, perenifólia, secundária inicial, que apresenta de 1,5 a 8 m de altura (Carvalho 2006). Espécies perenifólias podem apresentar maior quantidade de fenóis em suas folhas, já que são compostos imóveis que permanecem nas folhas pelo maior tempo possível devido ao seu alto custo nutricional (Coley *et al.* 1985). Além disso, possuem folhas com canais resiníferos e glândulas secretoras diminutas, esparsas por toda face abaxial (Wanderley *et al.* 2005), que podem acumular terpenos ou taninos (Mauseth 1988). Fenóis, terpenos e taninos tem sido relacionados à atividade alelopática (Einhellig 2004; Duke & Oliva 2004). *R. umbellata* apresentou efeitos alelopáticos sobre a germinação e o crescimento inicial de espécies cultivadas *Lactuca sativa* L. (Asteraceae), *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) e *Allium cepa* L. (Liliaceae) (Novaes *et al.* dados não publicados).

Assim, a hipótese deste trabalho é que o extrato foliar aquoso de *R. umbellata* deve apresentar atividade alelopática sobre espécies infestantes de culturas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos do extrato aquoso foliar de *R. umbellata* com de um herbicida sintético sobre a germinação e o crescimento inicial de amendoim-bravo, capim-arroz e corda-de-viola, que são plantas infestantes de culturas agrícolas. Além disso, objetivou-se verificar se havia potencial que as folhas desta espécie sejam utilizadas em estudos de bios prospecção de herbicidas de origem natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização geográfica e climática do local de coleta e material vegetal da espécie doadora

A reserva de cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) *campus* São Carlos, SP (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) apresenta solo Latossolo Vermelho-Amarelo Álico, com ondulações suaves e 845 m de elevação acima do nível do mar (Lorandi *et al.* 1999). O clima da região segundo a classificação de KÖPPEN é do tipo CWA, tropical com inverno seco (de junho a Setembro) e verão quente e úmido (de dezembro a março) (Tolentino 1967). As médias históricas anuais de precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e déficit de pressão de vapor são aproximadamente 1506 mm, 21 °C, 71% e 0,72 kPa, respectivamente (Damascos *et al.* 2005).

A coleta de folhas saudáveis e totalmente expandidas da espécie doadora *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae Batsch ex Borkh.) foi realizada assistematicamente em dez indivíduos adultos em estação seca (julho de 2008), já que este estágio de desenvolvimento e estação climática condicionaram extratos foliares de *R. umbellata* com maior atividade alelopática (Novaes *et al.* dados não publicados). Neste período, não houve precipitação e a média mensal das temperaturas máxima, média e mínima foram 25,5, 18,5, e 11,5 °C, respectivamente. Estes indivíduos adultos apresentavam diâmetro na altura do solo de 3,0 a 15,5 cm e estruturas reprodutivas ou seus indicativos. As exsiccatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar – Brasil (voucher 7276).

Espécies infestantes

Para este estudo, foram utilizadas plantas infestantes de áreas agrícolas que têm apresentado resistência a herbicidas convencionais: amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae) (Vidal *et al.* 2007) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*

(L.) P. Beauv., Poaceae) (Juliano *et al.* 2010). A espécie infestante corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* (Drammer) O'Donnell, Convolvulaceae) também foi utilizada pois é apresenta grande infestação dos campos agrícolas do Brasil (Kissmann & Groth 1992). Amendoim-bravo e corda-de-viola são eudicotiledôneas nativas das Américas que afetam diversas culturas agrícolas (Kissmann & Groth 1992) e capim-arroz é uma monocotiledônea nativa de regiões da Europa e Ásia que afeta principalmente as culturas de arroz (Kissmann & Groth 1992; 1999). Os diásporos de corda-de-viola foram escarificados em ácido sulfúrico concentrado durante cinco minutos e, em seguida, lavados em água corrente (Azania *et al.* 2003). Essa metodologia foi empregada com objetivo de padronizar os resultados obtidos em testes de germinação e de comprimento inicial dessa espécie.

Preparação do extrato foliar

O extrato foliar aquoso foi preparado segundo Souza *et al.* (2010) e utilizado nos bioensaios de germinação e comprimento inicial de amendoim-bravo, capim-arroz e corda-de-viola. As folhas de *R. umbellata* foram secas em estufa (72 h, sob temperatura de 40 °C), moídas em moinho industrial até virar pó e empacotadas em embalagens plásticas. Os extratos aquosos foram realizados com a mistura do pó das folhas com água destilada, a 10 ou 5% de massa/volume (g/mL). Essa mistura permaneceu descansando durante 12h em refrigerador na temperatura de aproximadamente 4 °C. Após este período, os extratos foram filtrados em papel de filtro sobre um funil de Buckner conectado a um Kitasato acoplado a bomba de vácuo.

Os efeitos do extrato foliar de *R. umbellata* a 10 e 5% foram comparados com dois controles: um negativo contendo água destilada, e outro positivo contendo solução de herbicida sintético oxifluorfem (240 g/L) nas concentrações 10 e 5%, partindo da recomendação do fabricante (5 L ha⁻¹).

Bioensaios de germinação com as espécies infestantes

Os bioensaios de germinação foram realizados segundo Gatti *et al.* (2004), utilizando 5 mL do extrato foliar e da solução herbicida oxifluorfem à 10 e 5% e água destilada (controle) para umedecer duas folhas de papel de filtro que forravam o fundo de placas de Petri esterilizadas. Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 20 sementes ou diásporos por placa de Petri, mantidos em câmaras de germinação (B.O.D.) com fotoperíodo de 12 horas e climatizadas sob 28 °C, temperatura ótima para a germinação das espécies, confirmada em pré-teste. As contagens das sementes ou diásporos germinados

foram realizadas em intervalos de 24 horas (Ferreira & Aquila 2000). Foram considerados germinados aqueles que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (Ranal & Santana 2006). Utilizando-se destas contagens foi possível calcular porcentagem, tempo médio e entropia informacional da germinação (Ranal & Santana 2006).

Bioensaios de comprimento inicial com as espécies infestantes

Os bioensaios de comprimento inicial da parte aérea (PA) e radicular (PR) das espécies infestantes foram conduzidos com quatro repetições de dez sementes ou diásporos pré-germinados em água destilada (com radícula entre 2 e 4 mm) por caixa plástica, mantidas em câmaras com fotoperíodo de 12 horas e climatizadas sob 28 °C, temperatura ótima para a germinação das espécies, confirmadas em pré-teste. As caixas estavam forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com 20 mL do extrato foliar de *R. umbellata* ou da solução herbicida oxifluorfem à 10 e 5%, ou de água destilada (controle). As medidas de comprimento inicial foram realizadas após 5 dias da incubação utilizando-se um paquímetro digital. PA e PR (mm) foram consideradas como a distância do colo até o ápice meristemático do caule e do colo até o ápice meristemático da raiz principal, respectivamente (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2009).

Características físico-químicas do extrato foliar

O pH do extrato a 10 e a 5% foi medido usando um pHmetro. O potencial osmótico (P.O., mOsm/Kg) foi medido com um osmômetro automático (μ Osmotte, modelo 5004), utilizando-se 50 μ L de cada concentração do extrato à temperatura de 25 °C. Os valores de P.O. foram convertidos para pressão osmótica pela conversão de mOsm/Kg para MPa (Larcher 2000). O efeito do potencial osmótico foi testado sobre a porcentagem, tempo médio e entropia informacional de germinação e sobre o comprimento inicial de PA e de PS de amendoim-bravo, capim-arroz e corda-de-viola, utilizando-se soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) nas concentrações: -1, -2 e -3 MPa, em relação ao controle (água destilada).

Análise estatística

O delineamento dos experimentos em laboratório foi inteiramente casualizado. Além do grupo controle, foram utilizados dois tratamentos (extrato foliar aquoso de *R. umbellata* e herbicida sintético oxifluorfem) divididos em dois níveis de tratamento (duas concentrações: 10 e 5%). O número de repetições no grupo controle e nos tratamentos foi igual a quatro.

Testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software livre Bioestat 5.0 (Sociedade Civil de Mamirauá 2007). Os resultados foram testados quanto à normalidade por meio do teste Lilliefors. Diferenças significativas entre as médias oriundas do controle e das concentrações do extrato aquoso foliar e do herbicida oxifluorfem e das mesmas concentrações do extrato e do herbicida entre si foram testadas par-a-par usando-se Mann-Whitney (quando as médias não eram normais) e teste T (quando as médias eram normais), com nível de decisão (α) em $p < 0,05$ (Zar 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físico-químicas do extrato

Os valores de pH no extrato foliar de *R. umbellata* a 10 e 5% foram 5,41 e 5,6, respectivamente. Estes valores variaram dentro do limite de tolerância para plantas vasculares (Larcher 2000) e assim, bioensaios para avaliação da influência de pH sobre a germinação e o comprimento inicial das plântulas receptoras foram dispensados. Os valores de PO no extrato foliar a 10 e 5% foram -2,10 e -1,10 MPa, respectivamente. Não houve efeito de P.O. sobre a porcentagem e tempo médio de germinação e crescimento inicial de nenhuma das espécies infestantes.

Germinação

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o controle e as concentrações do extrato foliar aquoso e do herbicida oxifluorfem sobre a porcentagem de germinação das espécies infestantes estudadas (Figura 2.1 A, C e E). Não houve influência do extrato e do herbicida sobre o tempo médio de germinação de amendoim-bravo (Figura 2.1 B).

O tempo médio de germinação de capim-arroz e corda-de-viola foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo controle que nas diferentes concentrações do extrato foliar aquoso e do herbicida oxifluorfem (Figura 1D e F). O extrato foliar e o herbicida aumentaram significativamente o tempo médio de germinação de capim-arroz (Figura 2.1 D). O tempo médio de germinação de corda-de-viola foi significativamente maior com o uso do extrato do que com o de herbicida sintético, nas duas concentrações estudadas (Figura 2.1 F).

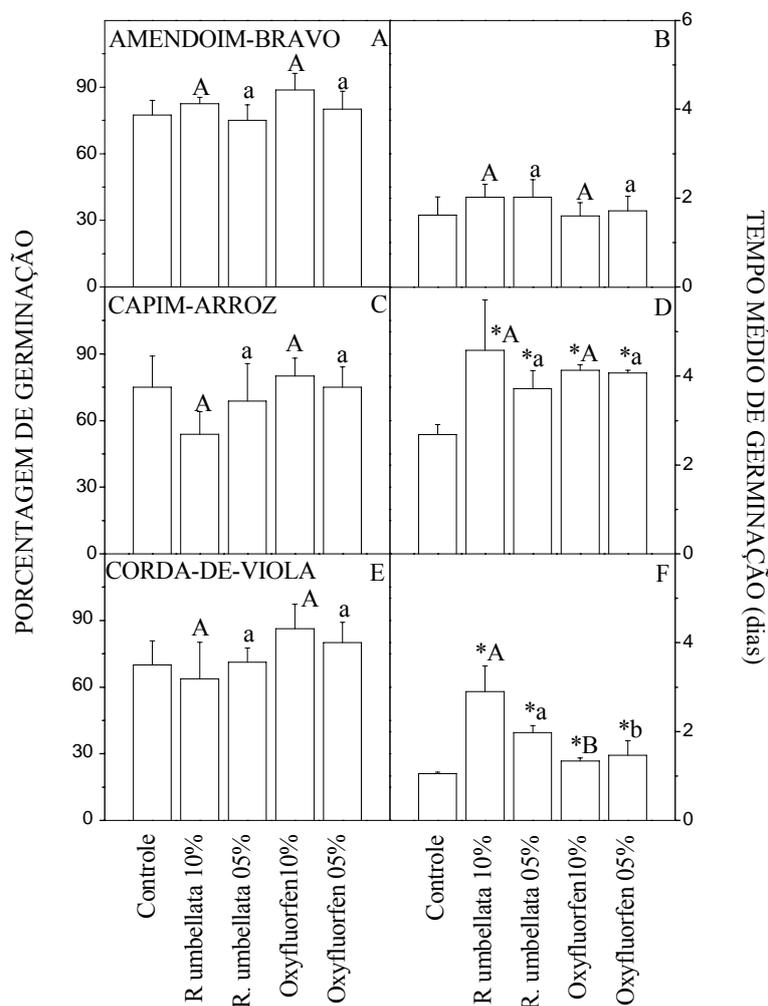


Figura 2.1 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de porcentagem e tempo médio de germinação de sementes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%. Asteriscos sobre as colunas indicam média significativamente diferente ($p < 0.05$) do controle, letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 10% e letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 5%.

A entropia informacional de germinação de amendoim-bravo não apresentou diferença significativa entre os resultados provenientes do controle e das concentrações 10 e 5% do extrato foliar e da solução herbicida oxifluorfem (Figura 2.2 A). Apenas as concentrações 10 e 5% do herbicida reduziram significativamente a entropia informacional de germinação de capim-arroz.

Os valores de entropia informacional são diretamente proporcionais ao tempo médio de germinação de uma semente (Ranal & Santana 2006). Apesar do tempo médio de germinação de capim-arroz ter aumentado quando os diásporos foram submetidos ao herbicida, estes germinaram de maneira sincronizada (por volta de 4 dias, dados não apresentados), o que reduziu fortemente o valor de entropia informacional de germinação.

Em corda-de-viola, a entropia informacional de germinação foi significativamente maior quando as sementes foram submetidas ao extrato foliar aquoso e ao herbicida sintético que no controle (Figura 2.2 C), mas a concentração 10% do extrato condicionou valores significativamente maiores que o herbicida.

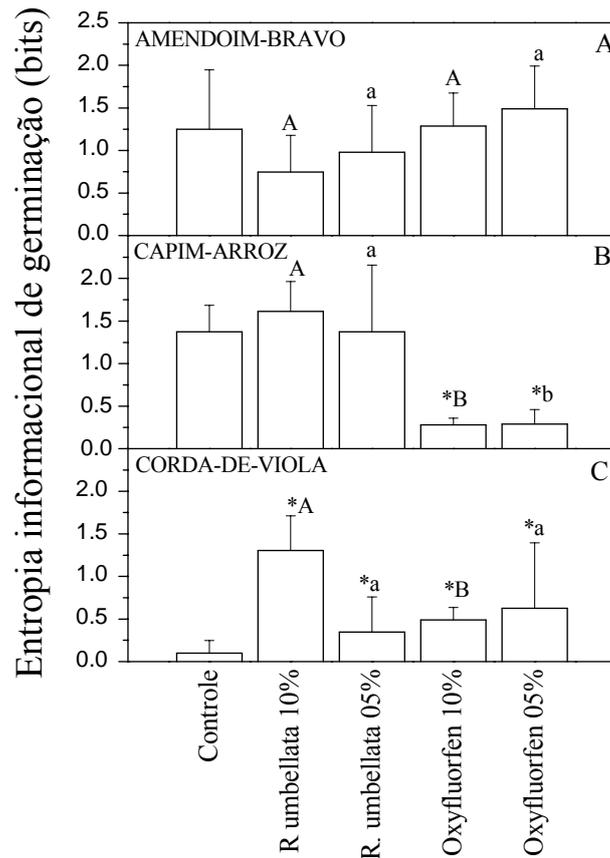


Figura 2.2 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de entropia informacional de germinação de sementes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%. Asteriscos sobre as colunas indicam média significativamente diferente ($p < 0.05$) do controle, letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 10% e letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 5%.

O processo germinativo de amendoim-bravo foi o menos afetado pelo extrato foliar e pelo herbicida entre as espécies receptoras, uma vez que seus valores de porcentagem, tempo médio e entropia informacional de germinação não foram alterados por essas soluções. Amendoim-bravo é uma espécie infestante que produz sementes em grandes quantidades, com elevada viabilidade (Kissman & Groth 1992). É uma planta que têm grande capacidade de multiplicação, que cresce com muita rapidez e compete fortemente por nutrientes do solo

e, por esses motivos, avança sobre as regiões subtropicais de diversos continentes (Kissman & Groth 1992).

Kern *et al.* (2009) afirmaram que as sementes de amendoim-bravo exibiram grande resistência a diversos aleloquímicos conhecidos, tais como rutina, quercitina, ácido aconítico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico e eucaliptol. O amendoim-bravo foi a espécie infestante menos afetada pela cumarina entre outras como corda-de-viola, *Bidens pilosa* L. e *Senna obtusifolia* L., mesmo em concentrações elevadas (Pergo *et al.* 2008). Portanto, amendoim-bravo é uma espécie infestante agressiva e difícil de ser controlada, mesmo na presença de soluções de fitotoxicidade conhecida.

O tempo médio e, conseqüentemente, a entropia informacional de germinação são fatores importantes na sobrevivência das plântulas infestantes, uma vez que plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido, menor competição por recursos e menor chance de se estabelecer no ambiente (Callaway & Walker, 1997). Em corda-de-viola, o extrato foliar inibiu mais fortemente os processos germinativos de tempo médio de germinação e entropia informacional de germinação do que o herbicida. Esses resultados revelam a alta concentração de aleloquímicos presentes nas folhas da planta doadora. Estes aleloquímicos certamente possuem rotas de ação que são novas (Macías *et al.* 2008) para as sementes de corda-de-viola, condicionando resultados mais vantajosos do que o herbicida. Os aleloquímicos podem ter afetado os processos germinativos das sementes de corda-de-viola, por exemplo, pelo aumento da atividade da amilase e maior liberação de reservas que seriam fornecido ao embrião (Singh *et al.* 2009), pela ampliação do estresse oxidativo e da dormência das sementes através do aumento na produção de ABA, e inibição da absorção de água por meio de alterações na permeabilidade das membranas (Bogatek *et al.* 2005).

Comprimento inicial das espécies infestantes

O extrato foliar aquoso e o herbicida sintético resultaram em comprimento inicial de PA e de PR de amendoim-bravo significativamente menor que o controle (Figura 2.3 A). As concentrações 10 e 5% do herbicida foram significativamente mais ativas sobre PA de amendoim-bravo que as do extrato foliar. Porém, estas concentrações do extrato foliar foram significativamente mais ativas sobre o comprimento de PR de amendoim-bravo que o herbicida.

Apenas o herbicida afetou significativamente o comprimento inicial de PA de capim-arroz (Figura 2.3 B). Os valores de comprimento de PR de capim-arroz foram

significativamente diferentes do controle tanto nas concentrações 10 e 5% do extrato foliar como do herbicida, mas o efeito da concentração 10% do extrato foi significativamente mais forte que a do herbicida.

O extrato foliar e o herbicida condicionaram comprimento inicial de PA e de PR de corda-de-viola significativamente menor que o grupo controle (Figura 2.3 C). No entanto, a concentração 5% do herbicida foi significativamente mais ativa sobre PA que a do extrato foliar. Já a concentração 10% do extrato foliar foi significativamente mais forte que a do herbicida sobre os valores de PR.

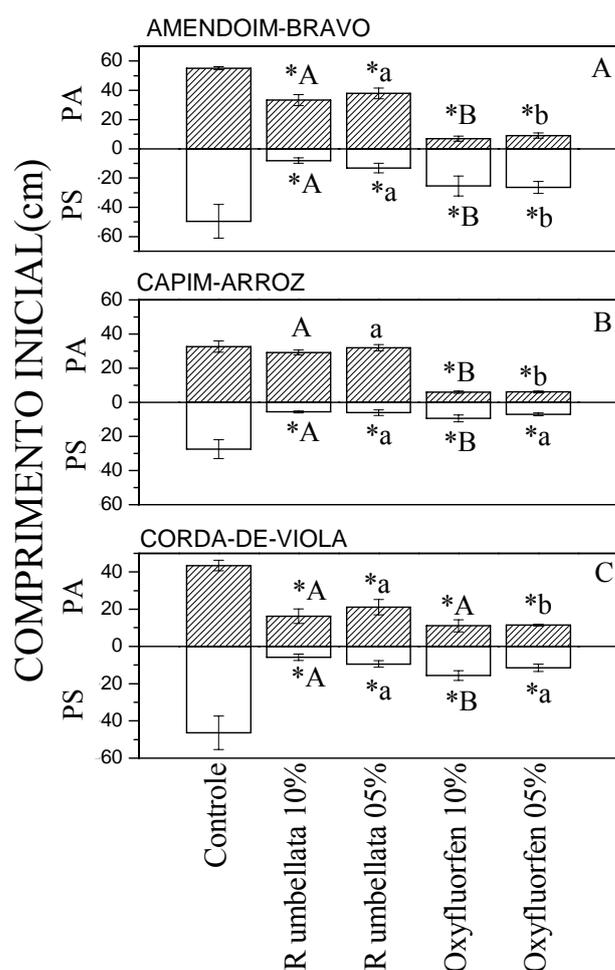


Figura 2.3 - Valores médios (colunas) e desvio-padrão (barras) de comprimento inicial (mm) das partes aérea (PA) e radicular (PR) de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle), extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) e herbicida sintético oxyfluorfen nas concentrações de 10 e 5%. Asteriscos acima ou abaixo das colunas indicam média significativamente diferente ($p < 0.05$) do controle, letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 10% e letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre o extrato foliar e o herbicida na concentração 5%.

De modo geral, o comprimento inicial da PA das espécies invasoras foi mais afetado pelo herbicida do que pelo extrato foliar. Oxifluorfem é um herbicida indicado para o controle de plantas infestantes, mono e eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2011).

Quimicamente, oxifluorfem é um herbicida de ação seletiva, não sistêmico, pertencente ao grupo químico dos difenileteres (DPEs). Esse grupo necessita de luz para ativar-se, o que sugere que sua fitotoxicidade esteja relacionada ao processo de fotossíntese (Hess 2000). Existem evidências de que DPEs ligam-se a enzima fotoporfirinogênio oxidase durante a biossíntese de clorofila e destroem membranas celulares vegetais como resultado da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Hess 2000). Deste modo, estes fatores explicam a maior atividade do herbicida oxifluorfem sobre o comprimento inicial de PA nas plantas infestantes.

O comprimento inicial da PR das espécies infestantes foi mais afetado pelo extrato foliar do que pelo herbicida. Isso sugere que as substâncias presentes no extrato foliar de *R. umbellata* não possuem ação semelhante a do herbicida oxifluorfem ou de seu grupo químico. Os aleloquímicos do extrato foliar podem estar mais envolvidos com processos relacionados ao crescimento das raízes, como: divisão celular, produção de hormônios, permeabilidade de membranas, absorção de minerais, atividade enzimática e relações hídricas (Ferreira & Aquila, 2000; Gniazdowska & Bogatek 2005).

Cruz-Ortega *et al.* (1998), por exemplo, observaram que os extratos aquosos de *Sicyos deppei* condicionaram desorganização dos tecidos e falta de diferenciação celular nas raízes de feijão, evidenciados por alterações ultra-estruturais na membrana plasmática, parede vegetal, mitocôndrias, retículo endoplasmático e na divisão celular. Seingh *et al.* (2009) observaram redução no conteúdo de proteínas e na atividade da nitrato redutase nos tecidos radiculares de milho submetido a lixiviados de *Nicotiana plumbaginifolia*. Outras explicações para a diminuição no crescimento das radículas quando submetidas ao estresse por extratos alelopáticos são a modificação da respiração mitocondrial que leva a uma diminuição na liberação de ATP para as células e a redução do aporte de íons (Gniazdowska & Bogatek 2005). Estas podem ser formas de interferência do extrato foliar de *R. umbellata* sobre crescimento inicial de PR das espécies infestantes.

Além do menor comprimento de PR, as duas concentrações utilizadas do extrato foliar condicionaram necrose da raiz principal e formação precoce de raízes laterais em relação ao controle em todas as espécies infestantes utilizadas (Figura 2.4). As plântulas de amendoim-bravo e corda-de-viola apresentaram inversão gravitropica (Figura 2.4).



Figura 2.4 – Anomalias observadas na parte radicular de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L., Euphorbiaceae), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L., Poaceae) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Drammer., Convolvulaceae) em água destilada (controle) e extratos foliares aquosos de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) nas concentrações de 10 e 5%. As imagens mostram as plântulas em dois níveis de aumento: de 3x (a) e 6x (b).

Como não houve danos em PA das espécies infestantes quando submetidas aos extratos foliares, os níveis de auxinas transportados de PA para as raízes pode ter continuado elevado. Nas raízes, as auxinas agem juntamente com estatólitos da columela (que são sensíveis a gravidade), condicionando crescimento geotrópico positivo (Aloni *et al.* 2006; Morita 2010). No entanto, com a necrose da coifa, e conseqüentemente dos estatólitos da columela, deve ocorrer crescimento desordenado da raiz e gravitropismo negativo de PR (Burgos *et al.* 2004; Tanimoto *et al.* 2008).

As citocininas são produzidas na coifa da raiz principal e, assim como as auxinas, controlam positivamente a curvatura geotrópica da raiz (Miyawaki *et al.* 2004). No caso da necrose da coifa, os níveis de citocinina são reduzidos e há indução de gravitropismo negativo da raiz (Aloni *et al.* 2006). A inversão gravitópica é útil às plântulas nessa situação, pois assim elas atrasam o contato das raízes laterais em formação com o extrato foliar.

A formação de raízes laterais é regulada diferentemente pelos hormônios auxina, etileno e citocinina. Níveis elevados de auxinas devem aumentar a produção de etileno nas plantas infestantes, já que afetam a atividade da ACC sintetase (Stepanova *et al.* 2007; Kondo *et al.* 2009). Além disso, o estresse induzido pelos extratos foliares em PR das plantas infestantes deve ter acarretado aumento de etileno e redução de citocininas (Zhang *et al.* 2003). Níveis reduzidos de citocinina e elevados de etileno e auxina devem ter estimulado a formação precoce de raízes laterais (Dayan *et al.* 2000; Aloni *et al.* 2006).

Meios de ação distintos de herbicidas convencionais são características desejáveis para que um extrato de uma planta possa ser usado em estudos de elaboração de herbicidas de origem natural. O extrato foliar aquoso de *R. umbellata* apresentou ação distinta do herbicida oxifluorfem sobre a germinação de corda-de-viola e sobre o crescimento inicial de PR de todas as espécies infestantes estudadas e portanto, possui potencial para ser utilizado em estudos de fracionamento biodirigido afim de que aleloquímicos presentes em suas folhas possam ser sintetizados como herbicidas de origem natural e biodegradáveis.

CONCLUSÕES

O extrato aquoso foliar foi mais ativo que o herbicida sintético oxifluorfem sobre o tempo médio e entropia informacional de germinação das espécies infestantes, principalmente em corda-de-viola. O comprimento inicial da parte aérea das espécies invasoras foi mais afetado pelo herbicida do que pelo extrato foliar. Porém, o comprimento inicial da parte radicular das espécies infestantes foi mais afetado pelo extrato foliar do que pelo herbicida,

condicionando necrose da coifa, inversão gravitrópica e formação de raízes secundárias em todas as espécies infestantes estudadas. O extrato aquoso foliar de *R. umbellata* apresentou resultados considerados promissores para ser utilizado em estudos de fracionamento e purificação de substâncias alelopáticas que possam ser empregadas como herbicidas de origem natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Azania, A.A.P.M., Azania, C.A.M., Pavani, M.C.M.D., Cunha, M.C.S. 2003. Métodos de superação de dormência em sementes de *Ipomoea* e *Merremia*. **Planta Daninha** **21**: 203-209.
- Bagchi, G.D., Jain, D.C., Cimap, P.O. 1997. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry** **45**: 1131 – 1133.
- Baker, H.G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. pp 147-172. In: Baker HG, Stebbins GL (eds) **The genetics of colonizing species**. New York, Academic Press.
- Bogatek, R., Oracz, K., and Gniazdowska, A. 2005. Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Pp. 292–296. In: Harper, J.D.I., An, A., Wu, H., and Kent, J.H. (eds.) **Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy**. Charles Sturt University, Wagga Wagga, Australia. International Allelopathy Society.
- Burgos, N.R., Talbert, R.E., Kim, K.S., Kuk, Y.I. 2004. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 671 – 690.
- Callaway, R.M., Deluca, T.H. Belliveau, W.M. 1999. Biological-control herbivores may increase competitive ability of the noxious weed *Centaurea maculosa*. **Ecology** **80**: 1196-1201.
- Callaway, R.M. & Walker L. R. 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. **Ecology** **78**: 1958–1965.
- Carvalho, P.E.R.C. 2006. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Embrapa Informação tecnológica, Brasília- DF. 627 pp.

- Colautti, R.I., Grigorovich I.A., MacIsaac, H.J. 2006. Propagule pressure: a null model for biological invasions. **Biological Invasions** **8**: 1023–1037
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defenses. **Science** **230**: 895 – 899.
- Copping, L.G. & Duke, S.O. 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science** **63**: 524-554.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B.E., Laguna-Hernández, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *curcubita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology** **24**: 2039-2057.
- Damascos, M.A., Prado, C.H.B.A., Ronquim, C.C. 2005. Bud composition, branching patterns and leaf phenology in cerrado woody species. **Annals of Botany** **96**: 1075-1084.
- Dayan F.E., Romagni, J.G. & Duke, S.O. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology** **26**: 2079-2094.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **17**: 4022-4034.
- Duke, S.O. & Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Duke, S.O. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research** **40**: 99-111.
- Einhellig, F.A. 2004. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Einhellig, F.A. & Souza, I.F. 1992. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. **Journal of Chemical Ecology** **18**: 1-11.
- Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente de ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal** **12**: 175-204.
- França, A. C., Souza, I. F., Santos, C. C., Oliveira, El. Q., Martinotto, C. 2007. Atividades alelopáticas de nim sobre o crescimento de sorgo, alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**. **32**: 1374-1379.

- Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A., Lima, M.I.S., 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esparanzae* O. Kuntze na germinação e no comprimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica** **18**: 459-472
- Gniazdowska, A. & Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum** **27**: 395-407.
- Hamilton, M.A., Murray, B.R., Cadotte, M.W., Hose, G.C., Baker, A.C., Harris, C.J. Licari, D. 2005. Life-history correlates of plant invasiveness at regional and continental scales. **Ecology Letters** **8**: 1066–1074
- Hess, F.D. 2000. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science** **48**:160-170.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2010. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília. IBAMA.
- Juliano L.M., Casimero, M.C. & Llewellyn, R. 2010. Multiple herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in direct-seeded rice in the Philippines. **International Journal of Pest Management** **56**: 299–30
- Kern, K.A. Pergo, E.M., Kagami, F.L., Arraes, L.S., Sert, M.A., Ishii-Iwamoto, E.L. 2009. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry** **47**: 1095-1101.
- Kissmann, K.G. & Groth, D. 1992. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo I. São Paulo. Basf Brasileira.
- Kissmann, K. G. & Groth, D. 1999. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo II. São Paulo. BASF Brasileira.
- Kondo S., Meemak, S., Ban, Y., Moriguchi, T., Haradad, T. 2009. Effects of auxin and jasmonates on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology** **51**: 281–284
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos. Rima Artes e Textos.
- Lorandi, R., Castro, D.M., Feres, R. 1999. Carta Pedológica das Áreas Urbana e Suburbana de São Carlos (SP). **Revista Brasileira de Cartografia** **51**: 9-15.
- Macías, F.A., Oliveiros-Bastidos, A., Marin, D., Carrera, C., Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G. 2008. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review** **7**: 179-194.

- Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Galindo, J.C.G., Varela, R.M., Simmonet, A.M., Castellano, D. 2001. The use of allelopathic studies in the search of natural herbicides. **Journal of Crop Production** **4**: 237-255.
- Mallik, U.A. 2008. Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. Pp. 25-38. In. Zeng, R. S., Mallik, A. U. & Luo, S. M. (Ed). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. New York. Springer Science + Business Midia.
- Mauseth, J. 1988. **Plant Anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings. Cap. 9: Secretory Cells and Tissues, p.141-166.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento http://bopar.com.br/arquivos/20090915_103917_4.pdf (Acessado em 10/01/2011).
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. **Plant Journal** **37**: 128 – 138.
- Morita, M.T. 2010. Directional gravity sensing in gravitropism. **Annual Review Plant Biology** **61**: 705–20
- Nishiyama, S., Doi, F., Okano, T., Ohara, H., Sugai, T., Hasegawa, K., Shigemori, H. 2005. Plant growth inhibitors containing heliannuols and their use as herbicides. **Japanese patent JP 2005112739 A2**.
- Oliveros-Bastidas, A.J. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva** **7**: 1-34.
- Peres, F. & Moreira, J. C. 2007. **Saúde e Ambiente e Sua Relação Com o Consumo de Agrotóxicos em um Pólo Agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública.
- Pergo, E.M., Abraham, D., Soares, Da Silva, P.C., Kern, K.A., Silva, L.J., Voll, E. and Ishii-Iwamoto, E.L. 2008. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of Chemical Ecology** **34**: 499–507.
- Preston, C. 2005. Herbicide detoxification: herbicide selectivity in crops and herbicide resistance in weeds. **ACS Symposium Series** **899**:195-204.
- Ranal, M.A. & Santana, D.G., 2006. How and why to measure the germination process. **Revista Brasileira de Botânica** **29**: 1-11.

- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. Orlando, Academic Press.
- Singh, A., Singh, D., Singh, N.B. 2009. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation** **58**:163–171.
- Sociedade Civil de Mamirauá. 2007. **Bioestat: Aplicações estatísticas na área de biociências**. Belém. Sociedade Civil de Mamirauá.
- Sutherland, S. 2004. What makes a weed a weed: life history traits of native and exotic plants in the USA. **Oecologia** **141**: 24 – 39.
- Souza-Filho, A.P.S., Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhom, G.M.P., Santos, A.S., Arruda, M.S.P., Muller, A.H., Arruda, A.C. 2006. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha** **4**: 649-656,
- Souza, F.M., Gandolfi, S., Perez, S.C.J.G.A, Rodrigues, R.R. 2010. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta botanica brasílica** **24**: 169-174.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., & Alonso, J.M. 2007. Multilevel Interactions between Ethylene and Auxin in *Arabidopsis* Roots. **The Plant Cell** **19**: 2169–2185.
- Tolentino, M. 1967. **Estudo crítico do clima de São Carlos**. Prefeitura municipal de São Carlos.
- Tanimoto, M., Tremblay, R., Colasanti, J. 2008. Altered gravitropic response, amyloplast sedimentation and circumnutation in the *Arabidopsis* shoot gravitropism 5 mutant are associated with reduced starch levels. **Plant Molecular Biology** **67**:57–69.
- Vidal, A.R., Muzzel, M.T., DePrado, R., Pedro, J.R.S. Vila-Aiub, M. 2007. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **International Journal of food, agriculture and environment** **5**: 265-269.
- Vyvyan, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron** **58**: 1631–1646
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S. & Giulietti, A.M. 2005. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Carlos. Rima Editora.
- Zar, J.H. 2010. **Biostatistical analysis**. New Jersey. Prendice Hall.
- Zhang, Y.J, Lynch, J.P. and Brown, K.M. 2003. Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. **Journal of Experimental Botany** **54**: 2351-2361.

CAPÍTULO 3

Atividade alelopática de frações acetônicas de folhas de *Rapanea umbellata* (mart.) mez (Primulaceae) contendo (-)-catequina e luteína

RESUMO

(Atividade alelopática de frações acetônicas de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) contendo (-)-catequina e luteína). Ambientes estressantes como os de cerrado devem favorecer uma maior variedade de aleloquímicos nas plantas, os quais são fontes potenciais de pesticidas e herbicidas de origem natural. Assim, a hipótese deste trabalho é que as folhas de *Rapanea umbellata* provenientes do cerrado brasileiro apresentem metabólitos secundários que sejam alelopáticos com interesse agrônômico. Para que houvesse um direcionamento da purificação destes compostos, foram realizados bioensaios de coleóptilos de trigo e de germinação e comprimento inicial de agrião, alface, cebola e tomate sob os efeitos de extratos hexânico, diclorometânico, acetato etílico, acetônico e metanólico das folhas secas de *R. umbellata* e comparados com os de água destilada e herbicida sintético Logran®. Após constatada a maior atividade do extrato acetônico, este foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica de fase normal, gerando frações denominadas desde A à I. As frações E e H foram submetidas então a novos fracionamentos em coluna de sílica de fase normal e reversa, respectivamente. A fração E deu origem sub-frações de E1 à E5, sendo que a E3 foi purificada através de CLAE e identificada após espectros de RMN¹H e ¹³C como luteína. A fração H deu origem sub-frações de H1 à H9, sendo que a H5 foi purificada através de coluna Sephadex e identificada após espectros de RMN¹H e ¹³C como (-)-Catequina. A presença desta substância em *R. umbellata* pode significar não só um melhor estabelecimento desta espécie no cerrado por meio da alelopatia, mas também que seja mais resistente à ação de plantas infestantes ou invasoras. É possível que (-)-Catequina seja utilizada em estudos para a formulação de herbicidas de origem natural contra plantas infestantes de culturas agrícolas.

Palavras-chave: aleloquímicos, fitotoxicidade, fracionamento.

ABSTRACT

(allelopathic activity of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) acetone leaf extracts fractions containing (-)-catechin and lutein). Cerrado (the Brazilian savanna) environments should favor higher allelochemicals quantities in plants. These allelochemicals are the main sources for natural pesticides and herbicides. This work hypothesis is that the leaves of *Rapanea umbellata* from Brazilian cerrado have allelopathic secondary metabolites and that these are of agronomic interest. To direct the purification of the compounds, wheat coleoptiles bioassays and watercress, lettuce, onion and tomato germination and initial length bioassays were performed under the effects of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone and methanol extracts of dried leaves of *R. umbellata*, distilled water (control group) and Logran® synthetic herbicide solution. The acetone extract was the most active and, therefore, was chromatographic fractionated through normal phase silica column, resulting in fractions from A to I. The E and H fractions were, respectively, submitted to normal and reverse silica columns. The E fraction gave rise to sub-fractions from E1 to E5. The E3 sub-fraction was purified through HPLC and identified by NMR¹H and ¹³C-NMR spectra as lutein. The H fraction gave rise to sub-fractions from H1 to H9. The H5 sub-fraction was purified through HPLC and identified by NMR¹H and ¹³C-NMR spectra as (-)-catechin. (-)-Catechin can be used in studies to formulate natural herbicides against agronomic infesting species. Besides, the presence of this substance in *R. umbellata* could signify not only better establish of this

species in cerrado by allelopathy, but also that this could be more resistant to the action of weed or invasive plants.

Key-words: allelochemicals, phytotoxicity, fractions.

INTRODUÇÃO

As plantas apresentam grande diversidade de metabólitos secundários. Eles, geralmente, estão associados com as defesas das plantas contra herbívoros e patógenos e podem estar envolvidos em uma ampla variedade de funções ecológicas (Bertin *et al.* 2003). As plantas podem liberar essas substâncias em seu ambiente, alterando a química do solo (Weidenhamer & Callaway, 2010), mediando interações com bactérias patogênicas simbiotes (Walker *et al.* 2010) e exercendo influência benéfica ou prejudicial sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas ou microrganismos vizinhos em um fenômeno chamado alelopátia (Rice 1984; Mallik 2008). Os estudos com aleloquímicos podem levar à produção de herbicidas quer para uso direto dos compostos descobertos, quer como modelos moleculares para síntese de novos agroquímicos (Macías *et al.* 2001; Dias & Dias 2007). Metabólitos secundários com atividade biológica são as principais fontes de novas estruturas químicas úteis para a produção de moléculas que podem ser usadas na farmacologia, na agronomia e em outros campos do conhecimento (Macías *et al.* 2008).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e responde pelo uso de 84% destes produtos em toda a América Latina (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis 2010). O uso indiscriminado e muitas vezes equivocado destes compostos contra plantas infestantes tem intoxicado as populações humanas e contaminado as comunidades biológicas (Peres & Moreira 2007). Além disso, muitas plantas invasoras de ambientes naturais e infestantes de sistemas agrofloretais crescem muito rapidamente e desenvolveram sistemas de resistência aos herbicidas sintéticos convencionais (Preston 2005).

Algumas destas resistências têm justamente origem no uso indevido destes compostos (Preston 2005). Doses inadequadas do herbicida glifosato, por exemplo, podem alterar a composição química destas plantas, com conseqüências pouco conhecidas (Lydon & Duke 1988). Assim, a busca por herbicidas naturais, que sejam biodegradáveis e não produzam as contaminações como dos herbicidas sintéticos, é de fundamental importância (Souza Filho *et al.* 2006). As vantagens de herbicidas de origem aleloquímica estão em serem solúveis em água, ausência de moléculas halogenadas, rotas alternativas de ação, interações mais específicas com as plantas-alvo, atividade em menores concentrações e menor dano ambiental

do que os herbicidas convencionais (Duke *et al.* 2000; Oliveros-Bastidas 2008; Macías *et al.* 2008).

O cerrado (savana brasileira) é considerado um *hotspot* e como tal é detentor de uma enorme diversidade biológica e, conseqüentemente, molecular (Myers *et al.* 2000). Além disso, o cerrado apresenta solo arenoso, ácido, distrófico e pobre em nutrientes (Haridassan 2001) e, portanto, podem condicionar maior quantidade de fenóis, taninos, fibras e outras defesas contra herbívoros (Bryant *et al.* 1985; Gershenzon 1984). Isto porque, com uma maior gama de defesas químicas, haveria menor predação e levaria a vantagem de poupar os nutrientes investidos no tecido foliar.

Rapanea umbellata (Mart.) Mez (Primulaceae) é uma espécie arbórea perenifólia presente no cerrado (Pinheiro & Carmo 1993). Espécies perenifólias podem apresentar maior quantidade de fenóis em suas folhas, já que estes compostos devem permanecer nas folhas pelo maior tempo possível devido ao seu alto custo nutricional (Coley *et al.* 1985). Além disso, *R. umbellata* possui folhas com canais resiníferos e glândulas secretoras diminutas, esparsas por toda face abaxial que podem acumular terpenos ou taninos (Mauseth 1988). Extrações com diclorometano das folhas de *R. umbellata* deram origem a três terpenos- ρ -ácido hidroxibenzóicos: um ácido benzóico (3-geranil-4-hidroxi-5-(3'',3''-dimetilalil)-ácido benzóico), um dihidrobenzofurano (5-carboni-7-(3'',''-dimetilalil)-2-(1'-hidroxi-1',5'-dimetilex-4'-enil)-2,3-dihidrobenzofurano) e um dihidrobenzopirano (6-carboxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-3 α -hidroxi-2 α -metil-2-(4'-metilpent-3'-enil)-3,4-dihidrobenzopirano) (Januário *et al.* 1991). Além disso, a família Primulaceae apresenta ainda flavonóides glicosídeos: myrcitrinas e quercetinas em *Myrsine seguinii* (Zhong *et al.* 1997); ácidos benzóicos: dihidrobenzofurano e um myricoidiol em *Rapanea myricoides* (Blunt *et al.* 1998); e saponinas triterpenóides: sakurasosaponina em *Rapanea melanophloeos* (Ohtani *et al.* 1993). Fenóis, flavonóides, ácidos benzóicos, terpenos e taninos têm sido relacionados à atividade alelopática (Einhellig 2004; Duke & Oliva 2004). Além disso, extratos foliares aquosos de *R. umbellata* demonstraram efeitos alelopáticos sobre espécies controle (cultivadas) e infestantes em estudos anteriormente realizados (Novaes *et al.* dados não publicados).

Assim, a hipótese deste trabalho é que as folhas de *R. umbellata* provenientes de cerrado apresentem metabólitos secundários que tenham atividade alelopática. O objetivo do trabalho é bioprospectar extratos foliares de *R. umbellata* para a purificação e isolamento de metabólitos secundários com atividade alelopática, que possam ser utilizados futuramente como herbicidas de origem natural

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, caracterização geográfica e climática da região de coleta

As coletas foram realizadas assistematicamente em plantas pertencentes a reserva de cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) *campus* São Carlos, SP (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). Folhas sadias e totalmente expandidas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae Batsch ex Borkh.) foram coletadas de dez indivíduos adultos em julho de 2008. Estes indivíduos apresentavam diâmetro na altura do solo de 3,0 a 15,5 cm, além de estruturas reprodutivas ou seus indicativos. As exsiccatas de *R. umbellata* foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar – Brasil (vouchers 7276).

Extração química

As folhas de *R. umbellata* foram secas em estufa (72h, sob temperatura de 40 °C), moídas em moinho industrial. O pó foi embalado à vácuo até seu processamento no Laboratório de Alelopatia na Universidade de Cádiz (Espanha), sob licença do IBAMA No 08BR002440/DF.

Primeiramente, foram realizadas extrações de 10 g de pó de folhas de *R. umbellata* e seus extratos utilizados em bioensaio de coleóptilo de trigo e de germinação e comprimento inicial de sementes receptoras. Para tanto, essa quantidade de pó de folhas foi diluída em 100 mL do solvente orgânico hexano e submetido a três series de ultra-som de 30 minutos (Rostagno *et al.* 2003; Albu *et al.* 2004). Após este tempo, a mistura foi filtrada em funil de Büchner, com papel de poro 0,22 µm, acoplado a uma bomba a vácuo, seca completamente em evaporador rotativo, e pesada. A massa resultante foi chamada de extrato hexânico (Figura 3.1).

O pó de folhas restante sobre o filtro foi então re-diluído em solvente orgânico diclorometano e submetido aos mesmos processos de extração, filtragem e secagem anteriores, gerando o extrato diclorometânico (Figura 3.1). Esse processo com o pó de folhas resultante na filtragem foi realizado ainda com os solventes orgânicos acetato de etila, acetona e metanol, gerando os extratos acetato etílico, acetônico e metanólico (Figura 3.1). Após a identificação do extrato que seria fracionado, o processo de extração foi repetido com 500 g de pó folhas de *R. umbellata* para que maior massa de extrato fosse obtida.

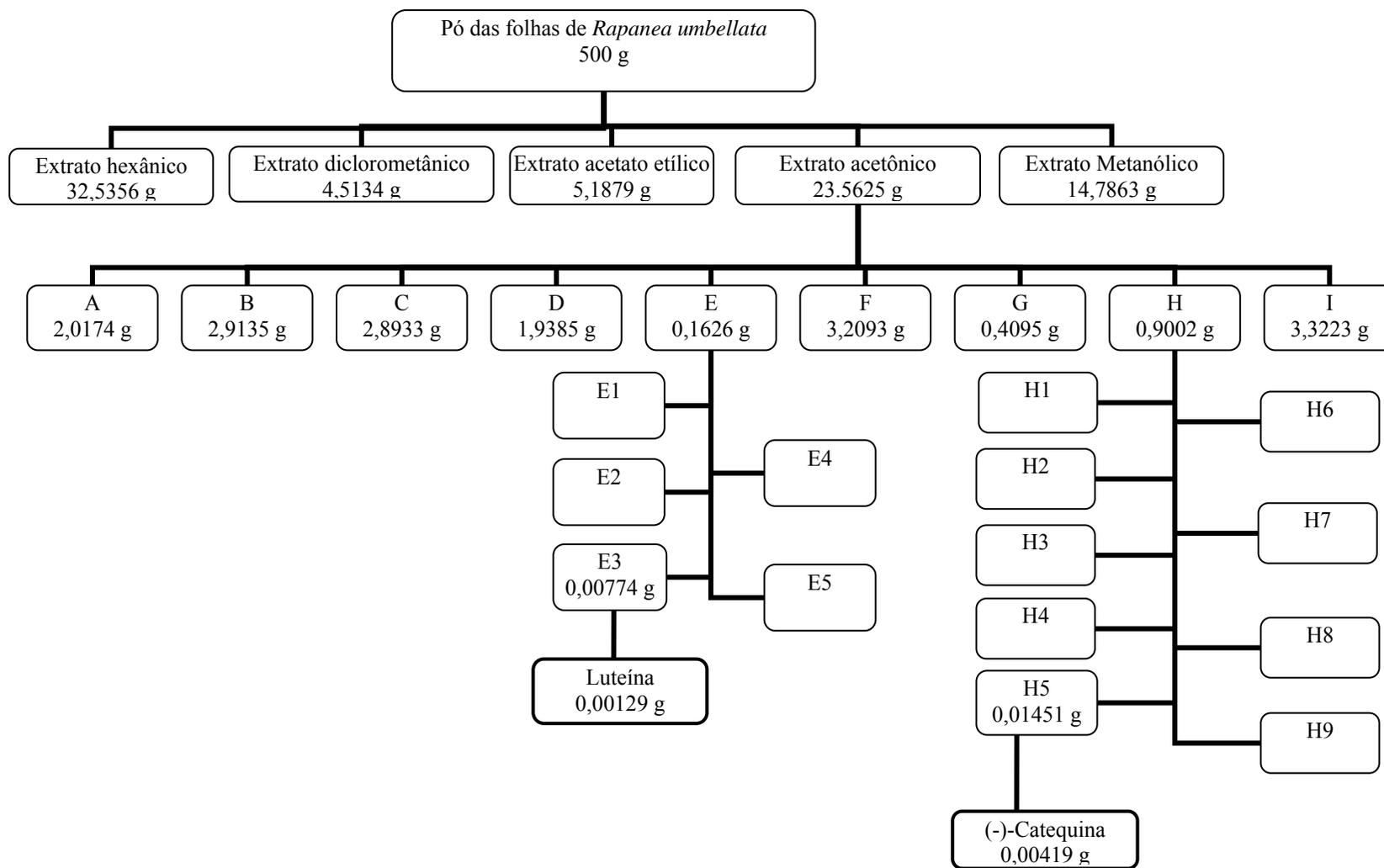


Figura 3.1 – Esquema que resume os procedimentos de extração, fracionamento, frações e as sub-frações para a purificação de luteína e (-)-Catequina das folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez.

Bioensaios de coleóptilo de trigo

Aproximadamente 100 sementes de trigo (*Triticum aestivum* L., Poaceae, variedade Cortez) foram adicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro forrada com papel de filtro e umedecida com água destilada. Este conjunto permaneceu em estufa a 24 °C (± 1 °C) durante cinco dias, na ausência de luz. Após este período, fragmentos de 4 mm foram fracionados do epicótilo das plântulas com o auxílio de uma guilhotina de Van der Weij, sob luz verde de segurança. Estes fragmentos foram mantidos até a sua utilização em meio nutritivo de uma solução tampão que continha ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, com 5,6 de pH (Nitsch & Nitsch 1956)

De cada um dos extratos (hexânico, diclorometânico, acetato etílico, acetônico, metanólico), ou das frações do extrato escolhido e fracionado, 9,6 mg foram dissolvidas em 5 µl/ml de dimetilssulfóxido (DMSO). A solução tampão descrita anteriormente foi adicionada a esta mistura, condicionando soluções nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Três tubos de ensaios contendo cinco fragmentos de coleóptilo e 2 ml de solução foram utilizados para cada concentração. Dois controles foram utilizados: um negativo contendo apenas solução tampão aquosa e DMSO, e outro positivo contendo a solução tampão aquosa, DMSO e o herbicida comercial Logran® (59% terbutrina, 0,6% triasulphoron) nas mesmas concentrações e com o mesmo número de repetições que as dos extratos.

Os tubos de ensaios contendo os coleóptilos em solução foram mantidos durante 24 horas em temperatura de 25 °C no escuro e sob constante rotação horizontal de 6 rpm. Após este período, os coleóptilos foram retirados dos tubos de ensaio e medidos com auxílio do programa Photomed®.

Bioensaio de sementes

Quatro espécies receptoras foram utilizadas, sendo três eudicotiledôneas: agrião (*Lepidium sativum* L., Brassicaceae), alface (*Lactuca sativa* L., Asteraceae) e tomate (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae); e uma monocotiledônea: cebola (*Allium cepa* L., Liliaceae).

De cada um dos extratos (hexânico, diclorometânico, acetato etílico, acetônico, metanólico) 26 mg foram dissolvidas em 5 µl/ml de DMSO. Essa mistura foi diluída em

solução tampão de pH 5,6, composta por 10mM de MES (ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico) e 1mM NaOH, em quantidades suficientes para obter as concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Quatro placas de Petri de 4 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro, receberam 1 mL de cada concentração de solução com cada extrato e 20 sementes das espécies receptoras. Foram ainda utilizados dois controles: um negativo contendo apenas solução tampão aquosa e DMSO, e outro positivo contendo a solução tampão aquosa e o herbicida comercial Logran® nas mesmas concentrações e com o mesmo número de repetições que as soluções com os extratos.

As placas foram seladas com Parafilm® e mantidas em câmara de crescimento, na ausência de luz, em temperatura de 25°C durante quatro, cinco, seis e sete dias, respectivamente, para as sementes de agrião, tomate, alface e cebola (Macías *et al.* 1999). Após estes períodos, foram realizadas as medidas de porcentagem de germinação e comprimentos iniciais da parte aérea (PA) e da raiz (PR), com auxílio do programa Fitomed 2.0®. A parte aérea (PA) e parte radicular das plântulas (PR) (mm) foram consideradas como a distância do colo até o ápice meristemático do caule e do colo até o ápice meristemático da raiz principal, respectivamente (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2009).

Fracionamento cromatográfico do extrato acetônico

Após a identificação do extrato acetônico como o de menor quantidade de clorofila e mais fitotóxico, o processo de extração foi repetido a partir de 500 g de pó de folhas de *R. umbellata* para a obtenção de maior massa, gerando 23,56 g de extrato acetônico. Essa massa foi aplicada em uma coluna de 6 cm de diâmetro e 60 cm de altura, contendo sílica gel (0,06 – 0,02 mm) como fase estacionária em pressão atmosférica. Utilizou-se uma série de eluentes, em ordem crescente de polaridade para a fase móvel: hexano/ acetona 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 e 40/60%, acetona 100% e metanol 100%. Este procedimento rendeu um total de nove frações (de A à I) de acordo com observação em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) (Figura 1). As placas cromatográficas tinham 0,25 mm de espessura com indicadores fluorescentes (Alugram Sil G/Uv 254, Machery Angel). Elas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, revelada com *Oleum* (solução de 4% de ácido sulfúrico, 80% de ácido acético e 16% água destilada) e aquecida a 150 °C.

Fracionamento cromatográfico da fração E do extrato acetônico

Para o fracionamento cromatográfico da fração E, foram aplicados 162,6 mg de amostra em uma coluna de 2,5 cm de diâmetro e 30 cm de altura contendo sílica gel (0,06 – 0,02 mm) como fase estacionária em pressão atmosférica. As misturas de solventes orgânicos escolhidos para eluir a coluna de sílica foram hexano 100%, hexano/acetato de etila 95/5, 90/10 e 80/20% e, por último, acetona 100%. Este procedimento rendeu um total de cinco sub-frações (de E1 - 5) de acordo com observação em CCDA. Cada placa cromatográfica foi eluída em mistura Hexano 80% - Acetona 20%, observada sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, revelada com *Oleum* e aquecida a 150 °C. A sub-fração E3 foi então preparada e submetida ao fracionamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC- High-performance liquid chromatography) equipada com canais de detecção L-7490. A coluna utilizada (Li Chrospher, SiO₂, Merck) foi preparativa, de preenchimento 7 e 10 µm, dimensões 250 x 10 nm. O fluxo de eluente foi de 3 ml/min.

Fracionamento cromatográfico da fração H do extrato acetônico

Para este fracionamento, aplicou-se 900 mg da fração H em uma coluna de 2,5 cm de diâmetro e 30 cm de altura, contendo sílica de fase reversa. As misturas de solventes orgânicos escolhidos para eluir a coluna de sílica foram clorofórmio 100%, clorofórmio/metanol: 95/5, 90/10, 80/20 e 60/40% e metanol 100%. Este procedimento rendeu um total de nove sub-frações (de H 1-9) de acordo com observação CCDA de fase reversa (Figura 1). A CCDA foi eluída em mistura clorofórmio 75% - metanol 25%, observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, revelada com *Oleum* e aquecida a 150 °C. A sub-fração H5 foi então preparada e submetida ao fracionamento em coluna de Sephadex, contendo a mistura hexano 50% - clorofórmio 25% - metanol 25%.

As sub-frações E3 e H5 isoladas e purificadas foram submetidas à análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H e ¹³C) (RMN¹³C, g - COSY, HSQC). Foram utilizados solventes deuterados conforme a solubilidade da amostra. Os aparelhos utilizados foram Inova 400 e 600 MHz.

Análise estatística

O delineamento dos experimentos em laboratório foi inteiramente casualizado. Além do grupo controle, foram utilizados seis tratamentos referentes aos extratos foliares (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e Logran®) e quatro tratamentos referentes às frações (E, G, H e Logran®), divididos em três níveis de tratamento (três concentrações: 800, 400 e 200 ppm). O número de repetições no grupo controle e nos tratamentos foi igual a quatro.

Testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software livre Bioestat 5.0. (Sociedade Civil de Mamirauá 2007). Os resultados foram testados quanto à normalidade por meio do teste Lilliefors. Diferenças significativas entre as médias oriundas do controle e das concentrações dos extratos, frações e do herbicida Logran® foram testadas usando-se Kruskal-Wallis (quando as médias não eram normais) e Anova seguida de Tukey (quando as médias eram normais), com nível de decisão (α) em $p < 0,05$ (Zar 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a completa secagem dos extratos na pré-extração com 10 g de folhas de *R. umbellata* nos solventes orgânicos, foram obtidas as quantidades e os rendimentos apresentados na Tabela 3.1. Os extratos hexânico e acetônico foram os que apresentaram os maiores rendimentos.

Tabela 3.1 – Massas e rendimentos dos extratos de 10 g folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em solventes orgânicos.

Solventes orgânicos	Massas dos extratos (mg)	Rendimento dos extratos (%)
Hexano	430	4,30
Diclorometano	63,6	0,63
Acetato de Etila	75,5	0,75
Acetona	362,5	3,62
Metanol	185,8	1,85

O comprimento dos coleóptilos foi significativamente menor nos extratos hexânico, acetato etílico e acetônico. Além disso, foi observada uma relação dose-resposta: quanto maior a concentração do extrato, menor o comprimento dos coleóptilos (Figura 3.2). Nenhum extrato foi tão inibitório quanto a solução herbicida Logran®.

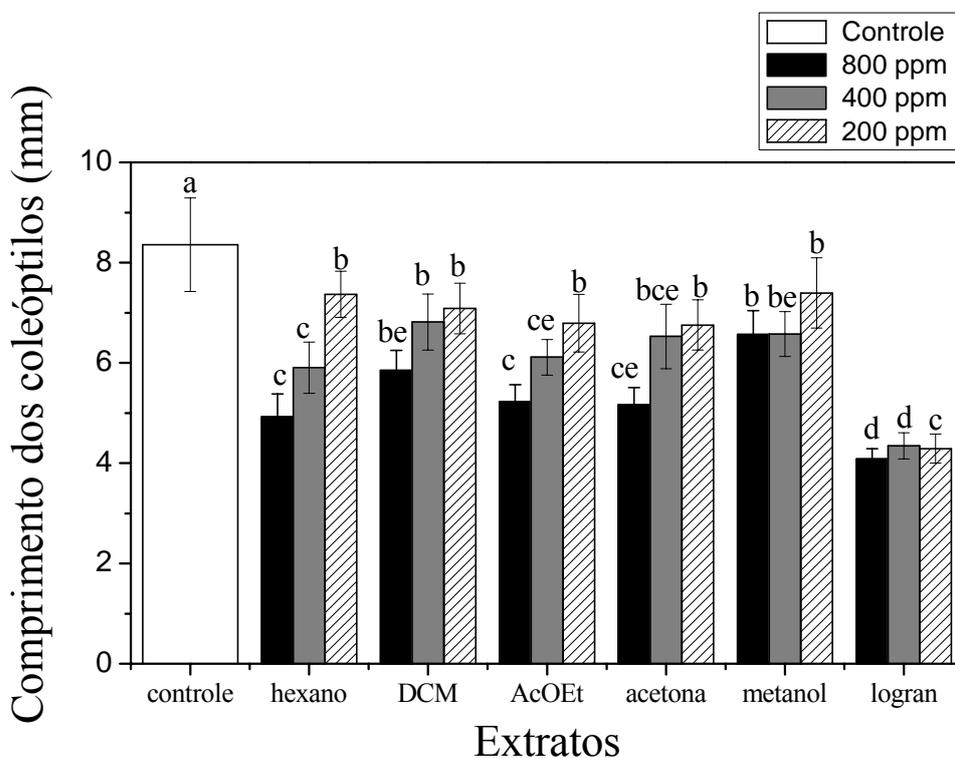


Figura 3.2 – Comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L., Poaceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle e a mesma concentração dos extratos e da solução herbicida Logran® ($p < 0.05$).

Com relação ao bioensaio de sementes, a germinação de agrião foi significativamente menor que o controle em pelo menos duas concentrações de todos os extratos foliares, com destaque para o acetato etílico, que foi ativo em todas as suas concentrações (Figura 3.3). A solução herbicida Logran® não teve efeito sobre a germinação de agrião.

Apenas o extrato foliar acetônico na concentração 800 ppm diminuiu significativamente o comprimento de PA de agrião em relação ao controle (Figura 3.3). Todas as concentrações da solução herbicida Logran® inibiram significativamente o comprimento de PA de agrião. Os extratos foliares diclorometânico e acetato etílico na concentração 800 ppm inibiram significativamente o comprimento de PR de agrião em relação ao controle (Figura 3.3). O extrato foliar metanólico e a solução herbicida Logran® só foram significativamente ativas sobre o comprimento de PR de agrião na concentração 400 ppm (Figura 3.3).

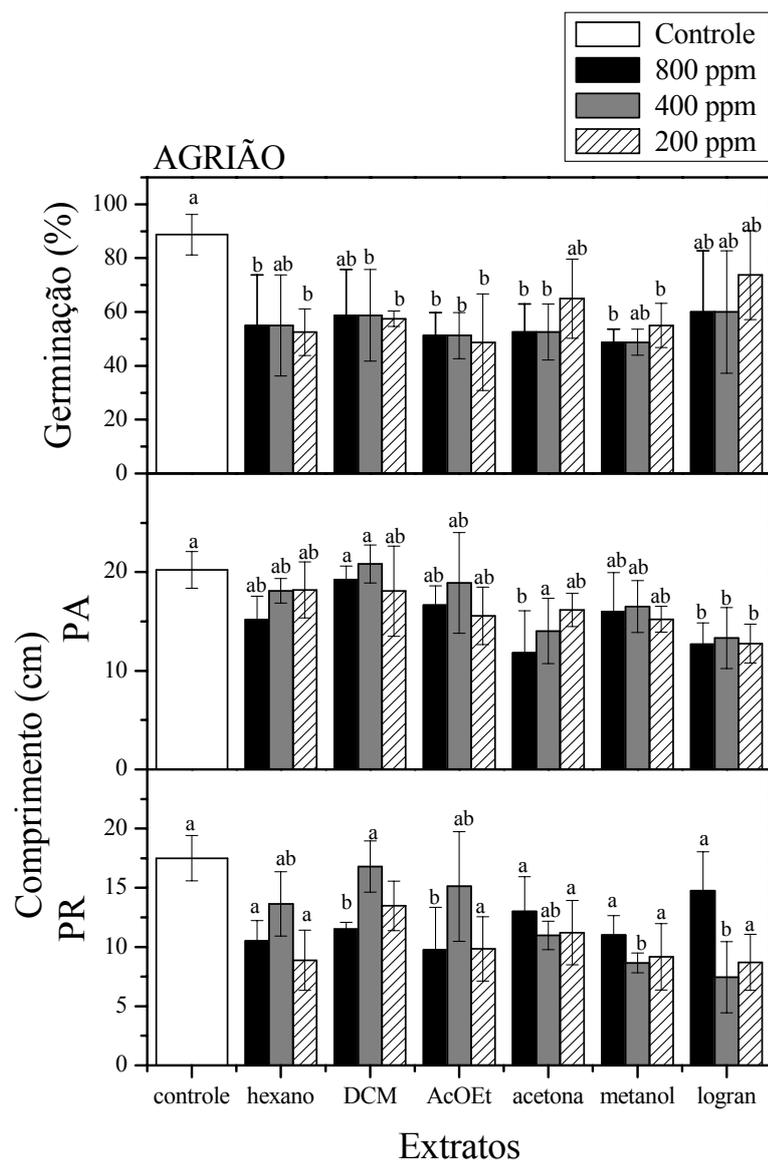


Figura 3.3 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de agrião (*Lepidium sativum* L., Cruciferaeae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle e a mesma concentração dos extratos e da solução Logran® ($p < 0.05$).

A germinação de alface não foi afetada nem pelos extratos foliares, nem pela solução herbicida Logran®. Os valores de PA de alface foram significativamente menores que o controle nos extratos foliares hexânico, acetato de etílico e acetônico nas concentrações 800 e 400 ppm. Os valores de PR de alface foram significativamente menores do que o controle no extrato foliar acetônico nas concentrações 800 e 200 ppm, e nos extratos foliares acetato etílico e metanólico nas concentrações 400 e 200 ppm. Todas as concentrações do herbicida sintético Logran® proporcionaram valores de PA e de PR de alface significativamente menores que as dos extratos foliares (Figura 3.4).

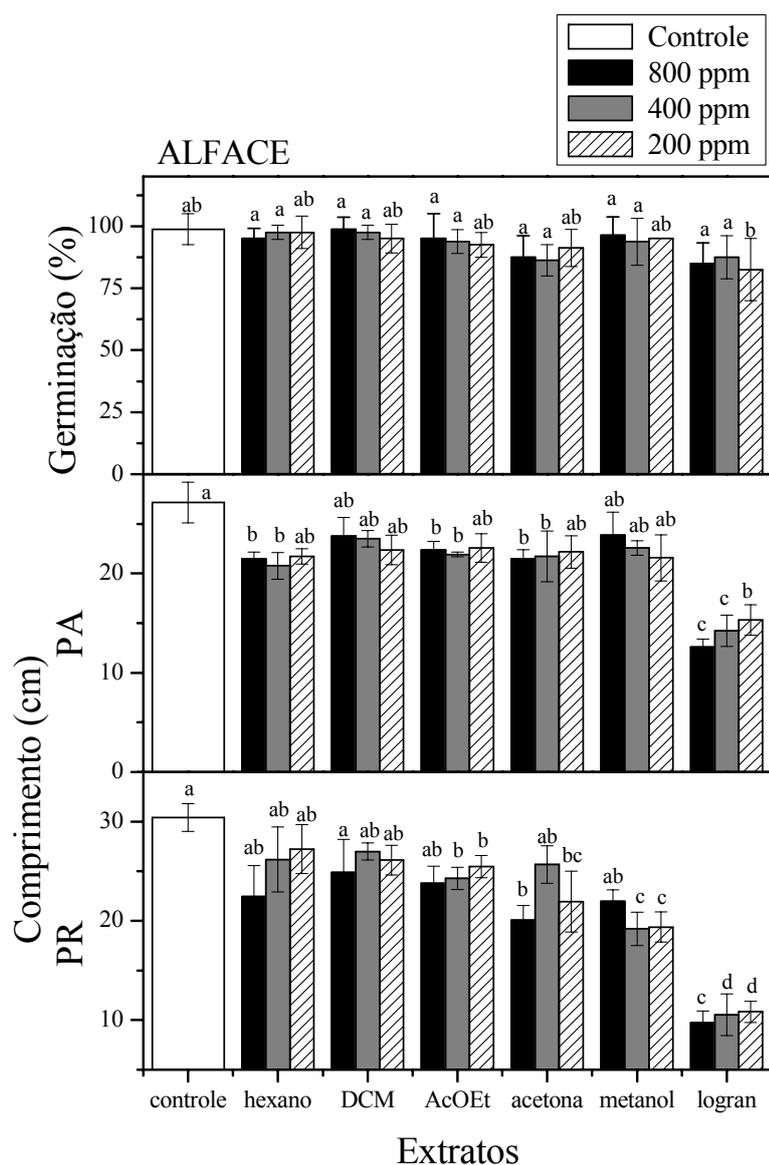


Figura 3.4 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de alface (*Lactuca sativa* L., Asteraceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle e a mesma concentração dos extratos e da solução herbicida Logran® ($p < 0.05$).

A germinação de tomate foi significativamente menor que o controle nas concentrações 800 e 400 ppm do extrato foliar acetônico (Figura 3.5). O extrato foliar acetato etílico reduziu significativamente a germinação de tomate na concentração 800 ppm. O comprimento de PA foi significativamente menor que o controle principalmente nos extratos foliares hexânico (todas as concentrações foram ativas), seguida pelo extrato foliar acetato etílico (ativa nas concentrações 800 e 400 ppm) (Figura 5). A solução herbicida Logran® condicionou resultados de germinação e de PA de tomate semelhantes aos extratos foliares com atividade significativa em relação ao controle. Todos os extratos foliares na concentração 800 ppm foram significativamente ativos sobre o comprimento de PR de tomate, mas o extrato foliar metanólico condicionou valores muito próximos aos do herbicida Logran® (Figura 3.5).

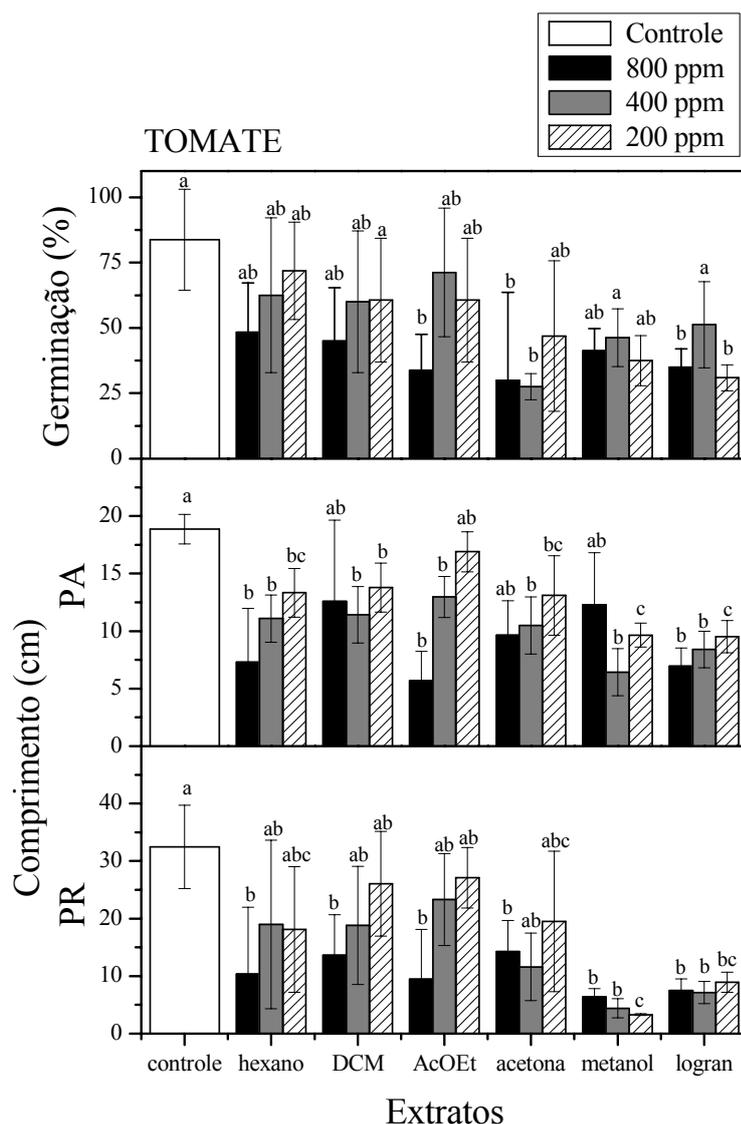


Figura 3.5 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de tomate (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle e a mesma concentração dos extratos e da solução herbicida Logran® ($p < 0.05$).

A germinação e o comprimento de PA de cebola não foram inibidos por nenhum extrato foliar. O comprimento de PR de cebola foi significativamente menor que o controle principalmente no extrato foliar acetônico (todas as concentrações foram ativas), seguido pelo extrato foliar metanólico (ativo em 800 e 400 ppm) A solução herbicida Logran® não apresentou atividade sobre a germinação de cebola, mas foi significativamente ativa sobre o comprimento de PA e de PR (Figura 3.6). A menor suscetibilidade da cebola aos extratos foliares e ao herbicida deve ser devido a ser a única espécie alvo monocotiledônea, e, portanto, detentora de raízes adventícias, e possuir metabolismo ácido das crassuláceas (MAC). As raízes adventícias devem prolongar a vida das plântulas. Já o metabolismo MAC proporciona menor susceptibilidade ao extrato e a herbicidas por condicionar menores perdas de água por cutículas espessas na epiderme, razão superfície/volume (Taiz & Zeiger 2009) e uso de nitrogênio para a síntese das enzimas de carboxilação (Richter 1993).

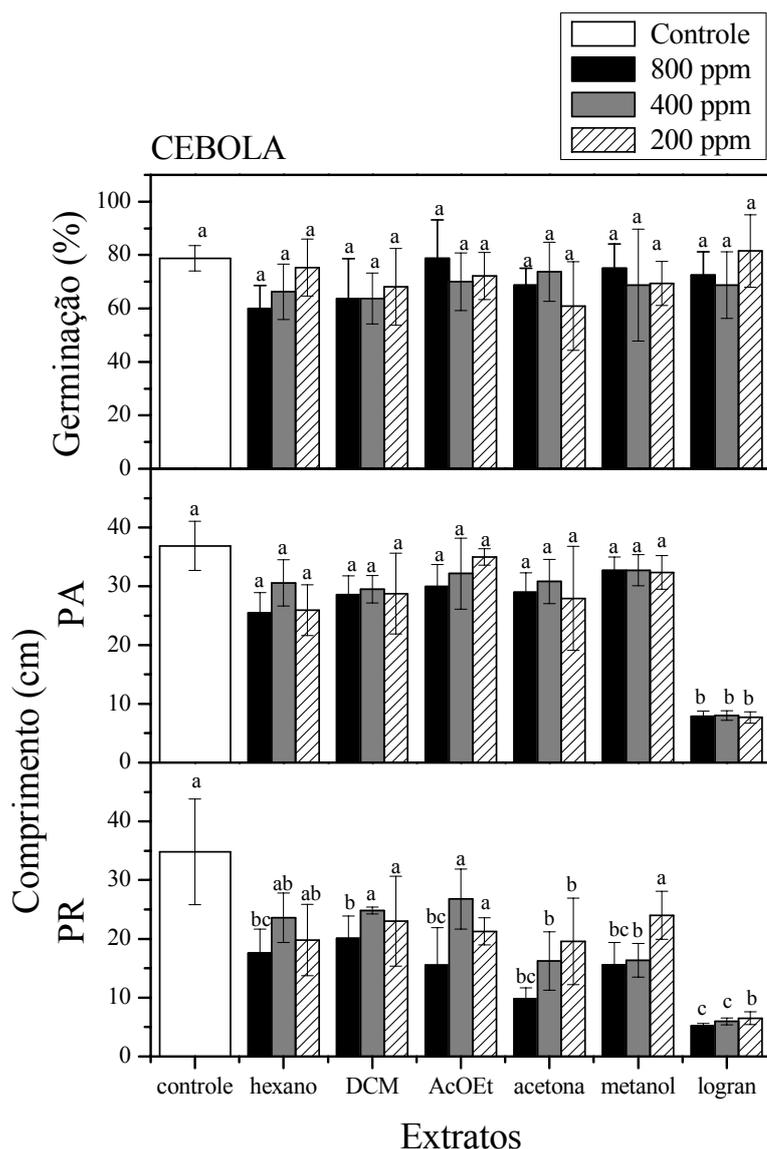


Figura 3.6 – Germinação e comprimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) de cebola (*Allium cepa* L., Liliaceae) em água destilada (controle), nos extratos de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em hexano (hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle e a mesma concentração dos extratos e da solução herbicida Logran® ($p < 0.05$).

O extrato acetônico foi escolhido para ser fracionado pois inibiu o crescimento dos coleóptilos e a germinação das espécies receptoras, foi um extrato que apresentou menor quantidade de clorofila (dada polaridade intermediária da acetona), e permaneceu ativo mesmo em concentrações mais baixas tanto agrião, alface e tomate, como em cebola, principalmente sobre os sistema radicular.

O processo de extração foi repetido a partir de 500 g de pó de folhas de *R. umbellata* para a obtenção de uma maior massa, gerando 23,56 g de extrato acetônico (Figura 3.1). O fracionamento cromatográfico do extrato acetônico resultou em nove frações (de A a I, Figura 3.1) nas quantidades apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Massa e rendimento das frações do extrato foliar de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em acetona.

	Massas das frações (g):	Rendimento das frações (%):
A	2,0174	10,08
B	1,9135	9,56
C	2,8933	14,47
D	1,9385	9,65
E	0,1626	0,81
F	3,2093	16,04
G	0,4095	2,04
H	0,9002	4,50
I	3,3223	16,61

As frações E, G e H foram escolhidas para serem utilizadas em um novo bioensaio de coleóptilos, já que apresentam menor quantidade de clorofila e seus componentes se separaram melhor por apresentarem fatores de retenção intermediários na CCDA eluida em mistura hexano 40%, - acetona 60%.

As frações E, G e H continham, respectivamente, 0,1624, 0,4095 e 0,9002 g (Tabela 3.2, Figura 3.1). A maior inibição do comprimento de coleóptilos foi proporcionada pelas frações E e H (Figura 3.7) e, portanto, foram escolhidas para serem fracionadas por técnicas cromatograficas.

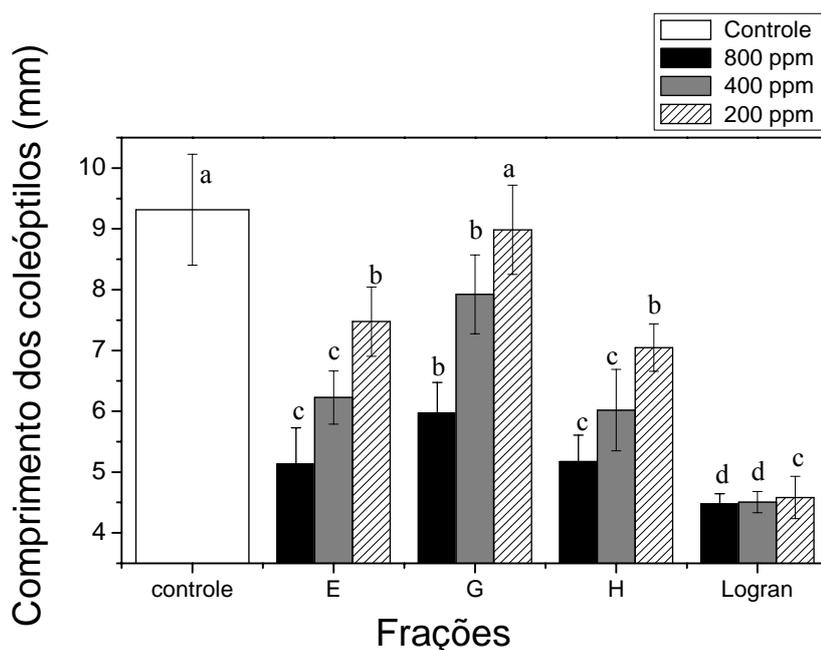


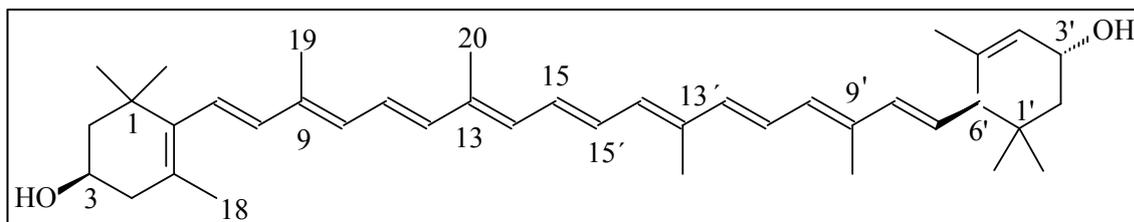
Figura 3.7 - Comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L., Poaceae) em água destilada (controle), nas frações E, G e H do extrato de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) em acetona e na solução herbicida Logran® nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Letras diferentes sobre as colunas indicam médias significativamente diferentes entre o controle, as mesmas concentrações das frações e do Logran® ($p < 0.05$).

O fracionamento da fração E deu origem a 0,0774 g da sub-fração E3. Este material foi purificado em CLAE, obtendo-se 0,012 g da substância majoritária (Figura 3.1) de coloração alaranjada forte que tornava-se azul intenso após a revelação. Os dados espectroscópicos do composto E3 coincidem com a literatura para luteína (Figura 3.8) (Molnár *et al.* 2004).

A luteína é uma substância que pertence ao grupo dos terpenos. Os terpenos são sintetizados a partir de Acetil CoA ou seus derivados. Ela contém 40 carbonos sendo, portanto um tetraterpeno que pertence ao sub-grupo dos carotenóides. Segundo Taiz & Zeiger (2009), os carotenóides de cor alaranjada (como a luteína encontrada) são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese, protegendo os tecidos contra a fotooxidação. Não existem relatos na literatura de carotenóides com atividades fitotóxicas. Porém, Oliveira

(2009) também observou atividade fitotóxica na fração onde luteína foi isolada do extrato foliar de *Solanum lycocarpum* em diclorometano.

A luteína é um carotenóide que apresenta importância para a saúde animal. Seu valor no mercado mundial gira em torno de US\$ 200 milhões (Wang *et al.* 2010). Ela é descrita como um agente de prevenção na degeneração de muitos tecidos de mamíferos, principalmente nos oculares (Landrum & Bone 2001). Os humanos não são capazes de sintetizar essa substância e, portanto, necessitam obtê-la por meio da alimentação (Johnson *et al.* 2000). Além da proteção contra a degeneração da mácula ocular em idade avançada, ela parece ser importante para fetos e recém-nascidos, já que é transmitida via cordão umbilical e no leite materno (Yeum *et al.* 1998). Outros estudos têm demonstrado que o consumo de luteína pode diminuir o risco de doenças cardiovasculares, câncer e catarata (Granado *et al.* 2003).



LUTEÍNA

$C_{40}H_{56}O_2$

UV (λ_{max} , hexano, nm): 421, 443, 472

IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3449 (OH); 3141 (C-H polieno); 1623 (C=C conj)

EM, m/z (int. rel.): 568 $[M]^+$, 550 $[M-H_2O]^+$, 532 $[M-H_2O-H_2O]^+$

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) e RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃):

¹H-RMN (399.952 MHz, CDCl₃): 0.84 (3H, s, H-16'), 0.99 (3H, s, H-17'), 1.07 (6H, s, H-16, H-17), 1.33 (1H, dd, J= 6 Hz, J= 13 Hz H-2a'), 1.46 (1H, t, J= 11.9 Hz, J= 11.9 Hz H-2□), 1.61 (3H, s, H-18'), 1.72 (3H, s, H-18), 1.76 (1H, ddd, J= 2.1 Hz, J=3.4 Hz, H-2□), 1.80 (1H, dd, J= 6Hz, J=3.4 Hz, H-2b'), 1.61 (3H, s, H-18'), 1.73 (3H, s, H-18), 1.90 (3H, s, H-19'), 1.96 (6H, s, H-20, H-20'), 1.97 (3H, s, H-19), 2.04 (1H, dd, J= 2 Hz, J₂=6 Hz, H-4a), 2.36 (1H, m, H-4b), 2.38 (1H, d, J=9 Hz, H-6'), 4.00 (1H, m, H-3), 4.24 (1H, m, H-3'), 5.40 (1H, dd, J=15 Hz, J=15 Hz, H-7'), 5.53 (1H, sa, H-4'), 6.11 (1H, sa, H-8), 6.23 (1H, sa, H-14'), 6.35 (1H, d, J=15Hz H-12'), 6.60 (1H, d, J=15 Hz, J=11Hz H-11')

Pos.	δ (ppm)						
1	37.1 (s)	11	124.8 (d)	1'	34.0 (s)	11'	124.5 (d)
2	48.4 (t)	12	137.5 (d)	2'	44.6 (t)	12'	137.5 (d)
3	65.9 (d)	13	136.5 (s)	3'	65.1 (d)	13'	136.4 (s)
4	42.5 (t)	14	132.6 (d)	4'	125.6 (d)	14'	132.6 (d)
5	126.2 (s)	15	130.1 (d)	5'	137.7 (s)	15'	130.0 (d)
6	138.0 (s)	16	28.7 (c)	6'	54.9 (d)	16'	29.5 (c)
7	124.9 (d)	17	30.2 (c)	7'	128.7 (d)	17'	24.3 (c)
8	138.5 (d)	18	21.6 (c)	8'	137.7 (d)	18'	22.9 (c)
9	135.7(s)	19	12.7 (c)	9'	135.1 (s)	19'	13.1 (c)
10	131.3 (d)	20	12.8 (c)	10'	130.8 (d)	20'	12.8 (c)

Figura 3.8 – Composto isolado da sub-fração E3 do extrato acetônico de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez.

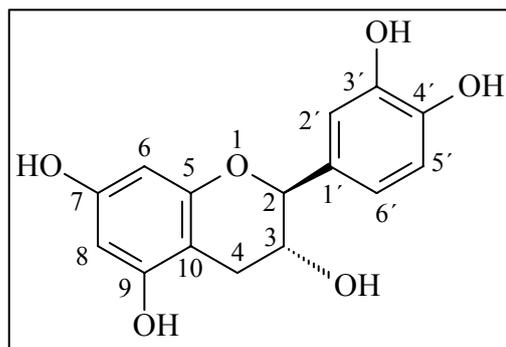
Foi possível aferir que as quantidades de luteína nos bioensaios de coleóptilos e de sementes com o extrato acetônico e com fração E eram de 0,10 e 0,60 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Concentração calculada de luteína e (-)-Catequina nas soluções contendo o extrato acetônico de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez e nas suas frações E e H.

	Concentração da solução (ppm)	Luteína Fração E ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(-)-Catequina Fração H ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Extrato acetônico	800	0,40	1,40
	400	0,20	0,70
	200	0,10	0,35
Frações	800	0,60	37,20
	400	0,30	18,60
	200	0,15	9,30

O fracionamento da fração H deu origem 0,145 g da sub-fração H5. A sub-fração H5 foi purificada em coluna contendo Sephadex, dando origem a 0,041 g de material puro (Figura 3.1). Este produto formava cristais esbranquiçados que tornavam-se marrom avermelhado após a revelação. Os dados espectroscópicos do composto H5 coincidem com a literatura para (-)-catequina (Figura 3.9) (Lôbo *et al.* 2008; Ayres & Chaves 2009).

Pode-se aferir havia entre 0,35 e 37,20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de (-)-catequina nos bioensaios de coleóptilos e de sementes com o extrato acetônico e com a fração H, respectivamente (Tabela 3.3).



(-) CATEQUINA

$C_{15}H_{14}O_6$

$[\alpha]_D^{25} = -14^\circ$ (MeOH, $c = 1$).

EM, m/z (int. rel.): 290 $[M]^+$

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) e **RMN¹³C** (100 MHz, CD₃OD):

Pos.	δ (ppm)	Mult.J(Hz)	δ_c (ppm)
2	4.56	<i>d</i> (8)	82.8 (d)
3	3.97	<i>dd</i> (8.0, 5.4)	68.8 (d)
4	2.51 2.81	<i>dd</i> (8, 16.0) <i>dd</i> (6, 16.0)	28.5 (t)
5	----	----	156.9 (s)
6	5.93	<i>d</i> (2.3)	96.3 (d)
7	----	----	157.8 (s)
8	5.85	<i>d</i> (2.3)	95.5 (d)
9	----	----	157.6

Pos.	δ (ppm)	Mult.J(Hz)	δ_c (ppm)
10	----	----	100.8 (s)
1'	----	----	132.2 (s)
2'	6.83	<i>d</i> (2.0)	115.2 (d)
3'	----	----	146.2 (s)
4'	----	----	146.2 (s)
5'	6.75	<i>d</i> (8.0)	116.1 (d)
6'	6.67	<i>dd</i> (2.0, 8.4)	120.0 (d)

Figura 3.9 – Composto isolado da sub-fração H5 do extrato acetônico de folhas de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez.

As catequinas são substâncias pertencentes ao grupo dos fenóis, que podem ter origem nas vias do ácido chiquímico ou mevalônico, e podem ser reguladas por fatores ambientais como níveis de nutrientes no solo, intensidade luminosa e infecções por patógenos (Taiz & Zeiger 2009). Dentro do grupo dos fenóis, as catequinas estão localizadas no subgrupo dos flavonóides, que ocorrem amplamente nos vegetais, sugerindo que podem conferir benefícios à planta produtora tanto sendo acumulados quanto liberados no ambiente (Chobot & Huber 2009). Eles podem agir tanto como pigmentos acessórios da fotossíntese, como protetores ao excesso de UVB sobre as folhas, ou como mediadores entre as plantas e a microbiota do solo (Taiz & Zeiger 2009).

A forma (-)-catequina é um dos quatro isômeros possíveis de catequina com o grupo hidroxila no anel B (Chobot & Huber 2009). (-)-Catequina foi descrita como fitotóxica, e (+)-catequina, como antimicrobiana (Bais *et al.* 2002). No Brasil, (±)-catequina foi identificada em plantas frutíferas nativas como tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), graviola (*Annona muricata* L) (Gonçalves *et al.* 2010), *Cordia multispicata* e *Tournefortia bicolor* (Da Silva *et al.* 2010), entre outras. As catequinas são ainda encontradas em vegetais como o cacau (*Theobroma cacao*), o café (*Coffea arabica*) e a erva mate (*Camellia sinensis*) (Chobot & Huber 2009). As sementes de *Sesbania virgata*, liberaram (+)-catequina em quantidades suficientes para inibir o comprimento e a massa radicular de plântulas de *Arabidopsis thaliana* e arroz (Simões *et al.* 2008).

(-)-Catequina tem sido indicada como a arma química de *Centauria maculosa* (Asteraceae), nativa da Eurásia, para se estabelecer como planta invasora em ambientes da América do Norte (Chobot & Huber 2009). A hipótese das “novas armas” prediz que o sucesso de plantas invasivas exóticas pode ser devido à produção de aleloquímicos que as espécies nativas nunca encontraram e para as quais ainda não desenvolveram defesas (Callaway & Ridenour 2004).

Assim como observado no presente estudo com extratos foliares, Bais *et al.* (2002, 2003), Kaushik *et al.* (2010) e Weir *et al.* (2003) demonstraram efeitos fitotóxicos de (-)-catequina exudada das raízes de *C. maculosa* em concentrações superiores as que estimamos nos bioensaios (Tabela 3.3).

Concentrações acima de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de (-)-catequina inibiram o crescimento de algumas plantas nativas da América do Norte e concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ regularam o crescimento destas plantas (Weir *et al.* 2003).

Bais *et al.* (2002) identificaram essa substância como sendo um aleloquímico seletivo e estava presente tanto nos exudados da raiz como no solo onde as plantas habitavam anteriormente. 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de (-)-catequina inibiu a germinação, reduziu a diferenciação das partes aéreas e radiculares de plantas receptoras (Bais *et al.* 2002) e causou a morte de células radiculares de *Arabidopsis thaliana* devido à produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Bais *et al.* 2003). Um dos modos de (-)-catequina agir sobre outras plantas é a indução da produção de ROS no meristema radicular das receptoras e, posteriormente, mudanças na expressão gênica e morte do sistema radicular (Bais *et al.* 2003; Kaushik *et al.* 2010).

Mais recentemente, Inderjit *et al.* (2008) estudaram os efeitos de (\pm)-Catequina sobre duas espécies nativas da Índia e da América do Norte, *Bambusa arundinacea* e *Koeleria macrantha*, respectivamente. As aplicações de (\pm)-catequina de 340 a 1020 $\mu\text{g g}^{-1}$ no solo foram reduzidas a concentrações de 1,4 a 36,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, sugerindo que esta substância deve ser oxidada em outros fenóis que podem ser mais ou menos tóxicos. Além disso, (\pm)-catequina apresentou fitotoxicidade mesmo em baixas concentrações, e. g. 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Inderjit *et al.* 2008). Pollock *et al.* (2009) observaram que a adição de metais levou a diminuição da concentração de (\pm)-catequina em solução devido a formação de complexos (\pm)-Catequina-metais. Em algumas plântulas receptoras, esses complexos foram ainda mais fitotóxicos do que quando apenas (\pm)-catequina foi aplicada (Pollock *et al.* 2009). Kaushik *et al.* (2010) acrescentaram que as respostas mediadas por ROS foram iniciadas na presença de metais de íons bivalentes. Deste modo, a forte presença de alumínio nos solos de cerrado poderia ainda intensificar os efeitos de (-)-catequina das folhas de *R. umbellata*.

Apesar destes resultados, alguns autores sugeriram que a hipótese de que (-)-catequina funcione como uma fitotoxina deva ser descartada. Segundo Duke *et al.* (2009a), os níveis de fitotoxicidade de (\pm)-catequina são muito menores que os encontrados para outras substâncias naturais consideradas tóxicas, além de ser uma substância muito comum nas plantas superiores. Duke *et al.* (2009b) refutam a idéia de (-)-catequina causar estresse oxidativo pois, segundo estes autores, é extremamente antioxidante. Chobot & Huber (2009) rejeitaram a hipótese de (\pm)-catequina ser uma nova arma contra plantas invasoras pois só inibiu o

crescimento de *Brassica nigra* e *Sinapsis alba* (Brassicaceae) em níveis elevados de estresse, induzido por concentrações sub-letais de metanol.

Para Inderjit (2008), as divergências quanto ao grau de fitotoxicidade de (±)-catequina devem-se as diferenças no grau de luminosidade, na presença de contaminantes nos frascos, nas condições de crescimento, nos métodos dos tratamentos e nas variedades das espécies alvo. A ausência de fitotoxicidade em Catequina em alguns trabalhos pode ainda ter sido devida a sua época de coleta, já que Tharayil & Triebwasser (2010) observaram exudação de (-)-catequina em pulsos diários dependentes da radiação. Estes mecanismos podem ter levado as divergências entre os trabalhos que afirmam (-)-catequina como pro-oxidante (indutora de ROS) e aqueles que afirmam ser antioxidante.

Weir *et al.* (2003) acrescentam que a presença de ácidos orgânicos como ácido salicílico também pode inibir a sinalização de ROS para a morte das células, podendo ser o modo de resistência de algumas plantas a (-)-catequina. Além disso, a exudação de oxalacetato nas raízes das plantas invadidas pode reduzir a ação de (±)-catequina (Thorpe *et al.* 2009). Estes mecanismos podem ter levado às diferenças de susceptibilidade entre as espécies receptoras que foram observadas no presente estudo.

Os resultados aqui apresentados corroboram os de Bais *et al.* (2002, 2003), Weir *et al.* (2003), Inderjit *et al.* (2008), Pollock *et al.* (2009), Kaushik *et al.* (2010), entre outros, que descrevem (-)-catequina como uma substância inibidora da germinação e do crescimento inicial de plântulas. A presença desta substância em *R. umbellata* pode significar não só um melhor estabelecimento desta espécie no cerrado por meio da alelopatia, mas também que seja mais resistente à ação de plantas infestantes ou invasoras. Além disso, há potencial para que (-)-catequina seja utilizada em estudos para a formulação de herbicidas de origem natural contra plantas invasoras ou infestantes.

CONCLUSÕES

A bioprospecção do extrato acetônico de *R. umbellata* resultou na purificação e isolamento de luteína e (-)-catequina. As frações e subfrações que continham essas substâncias demonstraram atividade alelopática sobre coleóptilos de trigo e sobre a germinação e comprimento inicial de PA e de PS de agrião, alface, tomate e cebola. (-)-

Catequina deve ser um aleloquímico e, portanto, pode ser utilizada em estudos para formulação de herbicidas de origem natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry** **11**: 261–265.
- Ayres, M.C.C. & Chaves, M.H.C. 2009. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova** **32**: 1509-1512.
- Bais, P.H., Walker, T.S. Stermitz, F.R. Hufbauer, R.A., Vivanco, J.M. 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. **Plant Physiology** **128**: 1173-1179.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Gillroy, S., Callaway, R.M., Vivanco, J.M. 2003. Allelopathy an exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science** **301**: 1377-1380.
- Bertin, C., Yang, X., and Weston, L. A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil** **256**: 67–83.
- Blunt, S.B., Chen, T.B., Wiemer, D.F. 1998. Prenylated benzoic acids from *Rapanea myricoides*. **Journal of natural products** **61**: 1400-1403.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S., Reichardt, P., Claussen, T. 1985. Adaptation to resources availability as a determinant of chemical strategies in woody plants. **Recent advances in Phytochemistry** **19**: 219 – 237.
- Callaway, R.M., Ridenour, W.M. 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in ecology and the environment** **2**: 436-443.
- Chobot, V. & Huber, C. 2009. (±)-Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? **Journal of Chemical Ecology** **35**: 950-996.
- Coley, P.D., Bryant, J.P., Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defenses. **Science** **230**: 895 – 899.

- Da Silva, T.B.C., Souza, V.K., Da Silva, A.P., Lemos, R.P.L., Conserva, L.M. 2010. Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. **Pharmaceutical Biology** **48**: 63-69.
- Dias, L.S. & Dias, A.S. 2007. Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias** **30**: 510-517.
- Duke, S.O., Blair, A.C., Dayan, F.E. 2009a. Is (-)-catechin a novel weapon of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*)? **Journal of Chemical Ecology** **35**: 141-153.
- Duke, S.O., Dayan F.E, Bajsa, J., Meepagala K.M, Hufbauer, R.A. and Blair, A.C. 2009b. The case against (-)-catechin involvement in allelopathy of *Centaurea stoebe* (spotted knapweed). **Plant Signaling & Behavior** **4**: 422-424.
- Duke, S.O. & Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Einhellig, F.A. 2004. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press.
- Ghershenzon, J. 1984. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: Timmermann, B.N., Steelin, C., Loewus, F.A. (eds.) **Recent advances in phytochemistry: phytochemical adaptations to stress**. New York. Plenum Press.
- Gonçalves, A.E.S.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. 2010. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of agricultural and food chemistry** **58**: 4666-4674.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. 2003. Nutritional and clinical relevance of luteinin human health. **British Journal of Nutrition** **90**: 487-502.
- Haridasan, M. 2001. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. Pp.68-83. In: McClain, M.E., Victoria, R.L & Richey, J.E. (ed). **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. New York. Oxford University Press.

- Inderjit, Pollock, J.L., Callaway, R.M., Holben. 2008. Phytotoxic effects of (\pm)-catechin *in vitro*, in soil, and in field. **Plos One** **3**: e2536.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2010. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília: IBAMA.
- Januário, A.H, Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.F. 1991. Terpeno-*p*-hydroxybenzoic acid derivatives from *Rapanea umbellata*. **Phytochemistry** **30**: 2019-2023.
- Johnson, E.J., Hammond, B.R., Yeum, K.J., Qin, J., Wang, X.D., Castaneda, C., Snodderly, D.M., Russell, R.M. 2000. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. **American Journal of Clinic Nutrition** **71**:1555–1562.
- Kaushik, S., Bais, H.P., Biedrzycki, M.L. & Venkatachalam, L. 2010. Catechin is a phytotoxin and a pro-oxidant secreted from the roots of *Centaurea stoebe*. **Plant Signaling & Behavior** **5**: 1-11.
- Landrum JT & Bone RA. 2001. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **385**: 28–40.
- Lôbo L.T., Castro, K.C.F., Arruda, M.S.P., da Silva, M.N., Arruda, A.C., Müller, A.H., Skelding, G.M., Arruda, P., Santos, A. S. 2008. Potencial Alelopático de Catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova** **31**: 493-497.
- Lydon, J. & Duke, S. O. 1988. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **36**:813–818.
- Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Castellano, D., Velasco, R.F. 1999. Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models (I): trans,trans-Germacranolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **47**: 4407–4414
- Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Galindo, J.C.G., Varela, R.M., Simmonet, A.M., Castellano, D. 2001. The use of allelopathic studies in the search of natural herbicides. **Journal of Crop Production** **4**: 237-255.
- Macías, F.A., Oliveiros-Bastidos, A., Marin, D., Carrera, C., Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G. 2008. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review** **7**: 179-194.

- Mallik, U.A. 2008. Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. Pp. 25-38. In: Zeng, R. S., Mallik, A. U. & Luo, S. M. (Ed). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. New York. Springer Science + Business Midia.
- Mauseth, J. 1988. Secretory Cells and Tissues. Pp. 141-166. In: **Plant Anatomy**. Menlo Park. Benjamin Cummings.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília.
- Molnár, P., Deli, J., Osz, E., Zsila, F., Simonyi, M., Tóth, G. 2004. Confirmation of the absolute (3R, 3'S, 6'R)-configuration of (all-E)-Epilutein. **Helvetica Chimica Acta** **87**: 2159-2167.
- Myers, N., Mittermeier R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** **403**: 853-858.
- Nitsch, J.P. & Nitsch, C. 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new sensitive, straight growth test for auxins. **Plant Physiology** **31**: 94–111.
- Oliveira, S.C. 2010. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Ohtani, K., Mavi, S., Hastettmann, K. 1993. Molluscidal and antifungal triterpenoids saponins from *Rapanea melanophloeos* leaves. **Phytochemistry** **33**: 83-86.
- Peres, F. & Moreira, J. C. 2007. **Saúde e ambiente e sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.
- Pinheiro, A.L. & Carmo, A.P.T. 1993. Contribuição ao estudo tecnológico da canela-azeitona, *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez, uma espécie pioneira. I. Características anatômicas da madeira. **Ciência Florestal** **3**: 121-145.
- Pollock, J.L., Callaway, R.M., Thelen, G.C., Holben, W.E. 2009. Catechin–metal interactions as a mechanism for conditional allelopathy by the invasive plant *Centaurea maculosa*. **Journal of Ecology** **97**: 1234–1242.
- Preston, C. 2005. Herbicide detoxification: herbicide selectivity in crops and herbicide resistance in weeds. **ACS Symposium Series** **899**:195-204.

- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. New York, Academic Press.
- Richter, G. 1993. *Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie.* (Trad. de RAYMOND, G.). Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Rostagno, M., Palma A. M., Barroso, C.G. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A 1012**: 119–128.
- Simões, K., Du, J., Kretzschmar, F.S., Broeckling, C.D., Stermitz, F.S., Vivanco, JM. & Braga, M.R. 2008. Phytotoxic Catechin Leached by Seeds of the Tropical Weed. **Journal of Chemical Ecology 34**: 681–687.
- Sociedade Civil de Mamirauá. 2007. **Bioestat: Aplicações estatísticas na área de biociências**. Belém. Sociedade Civil de Mamirauá.
- Souza-Filho, A.P.S., Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhom, G.M.P., Santos, A.S., Arruda, M. S.P., Muller, A.H., Arruda, A. C. 2006. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha 24**: 649-656.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed.
- Tharayil, N. & Triebwasser, D. J. 2010. Elucidation of a diurnal pattern of catechin exudation by *Centaurea stoebe*. **Entomology Soils & Plant Sciences 36**: 200-204.
- Thorpe, A.S., Thelen, G.C., Callaway, R.M. 2009. Root exudate is allelopathic in community but not in native community: field evidence for novel weapons hipotesis. **Journal of Ecology 97**: 641-654.
- Weir, T.L., Bais, H.P., Vivanco, J.M. 2003. Intraespecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (-)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Journal of Chemical Ecology 29**: 2397-2411.
- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moënné-Loccoz, Y., Bally, R. 2010. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist 189**: 494-506.
- Wang, X.C., Chen, L., Ma, C.L., Yao, M.Z., Yang, Y.J. 2010. Genotypic variation of beta carotene and luteína contents in tea germplasms, *Camellia sinensis* (L.) O. Kunze. **Journal of Food Composition and Analysis 23**: 9-14.
- Weidenhamer, J. D. & Callaway, R. M. 2010. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of Chemical Ecology 36**: 59–69.

- Yeum, K.J, Ferland, G., Patry, J., Russell, R.M. 1998. Relationship of plasma carotenoids, retinol and tocopherols in mothers and newborn infants. **Journal of American College of Nutrition** **17**: 442–447.
- Zar, J.H. 2010. **Biostatistical analysis**. Prendice Hall.
- Zhong, N.X., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., Takeda, Y. 1997. Three flavonol glycoides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry** **46**: 943-946.

CONCLUSÃO GERAL DA TESE

A atividade alelopática de suas folhas é influenciada em maior grau pela época de coleta (mais ativas em estação seca) do que pela idade das plantas. *R. umbellata* apresentou maior atividade alelopática quando as plantas eram adultas e *R. ferruginea*, quando as plantas eram jovens.

O extrato foliar aquoso de *R. umbellata* apresentou ação distinta do herbicida sintético oxifluorfem sobre a germinação e crescimento inicial da parte radicular das espécies infestantes amendoim-bravo, capim-arroz e corda-de-viola e, portanto, apresentou potencial para ser utilizado em estudos de bioprospecção de aleloquímicos em suas folhas.

A bioprospecção das folhas de *R. umbellata* condicionou o isolamento e a purificação das substâncias luteína e (-)-Catequina. A (-)-Catequina apresenta potencial para ser utilizada como herbicida de origem natural e biodegradável.

ANEXOS

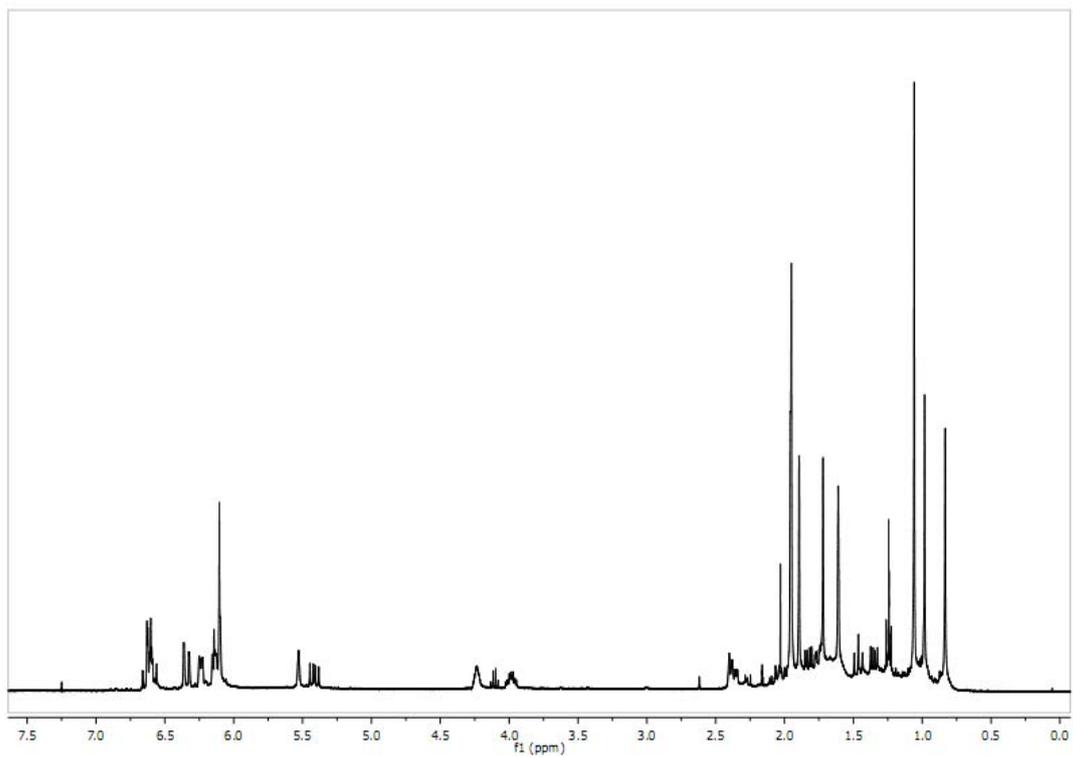


Figura 4.1 – Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de luteína

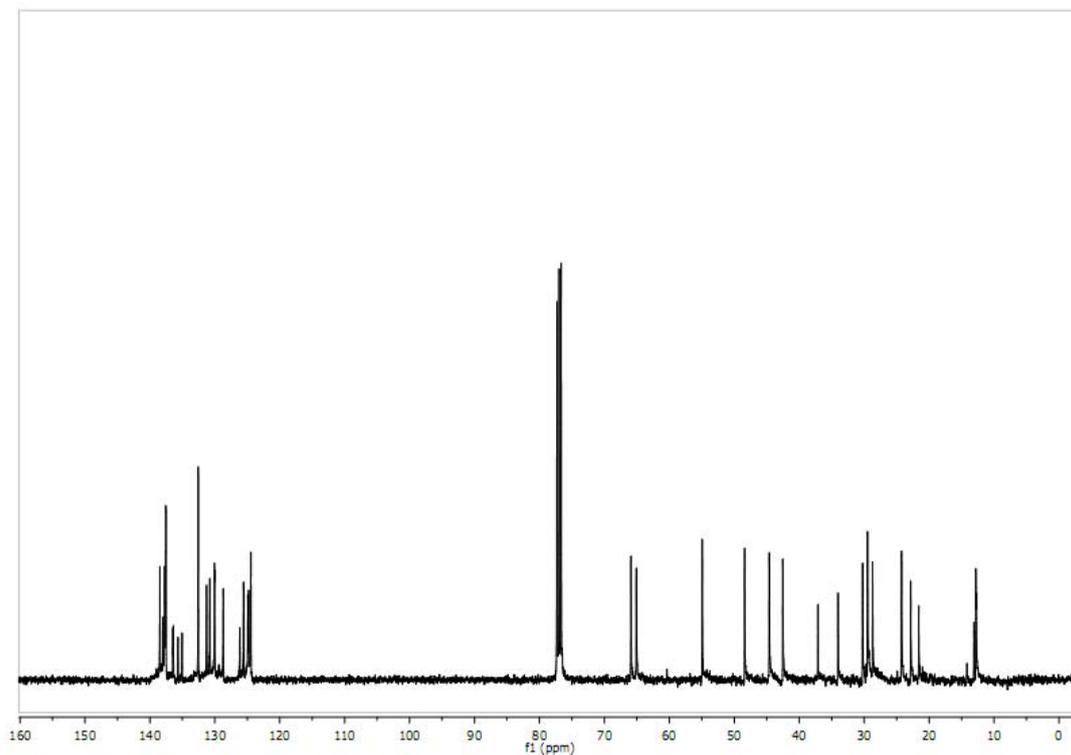


Figura 4.2 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de luteína

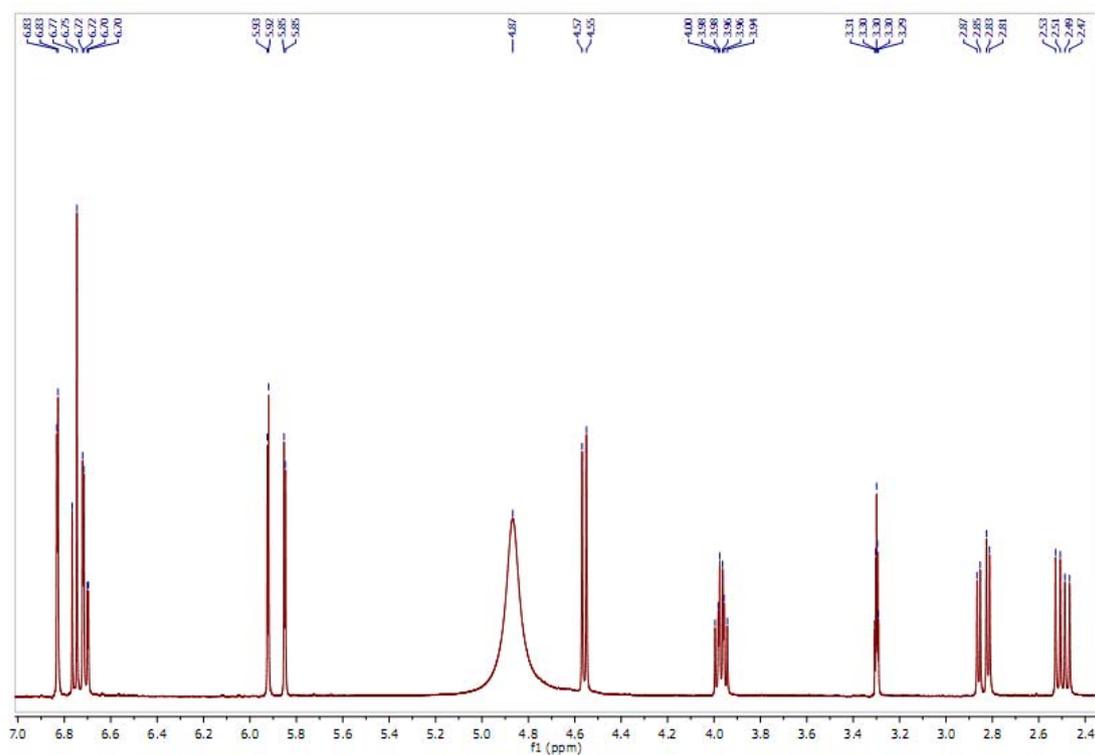
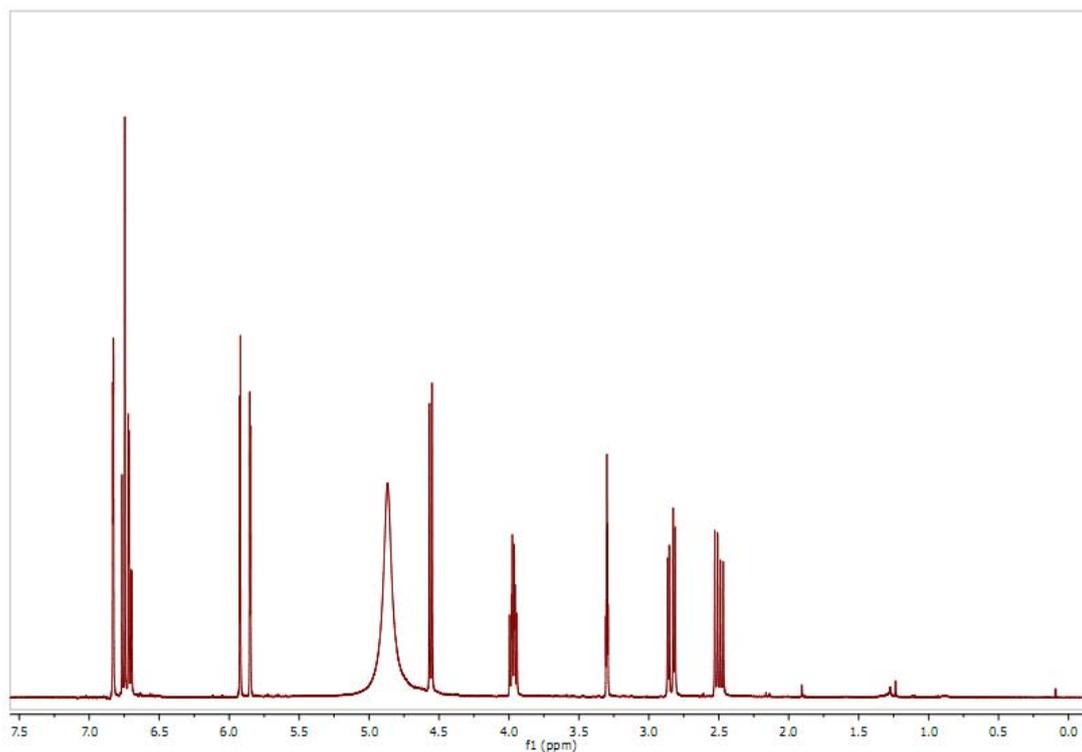


Figura 4.3 – Espectros de RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) de (-)-catequina

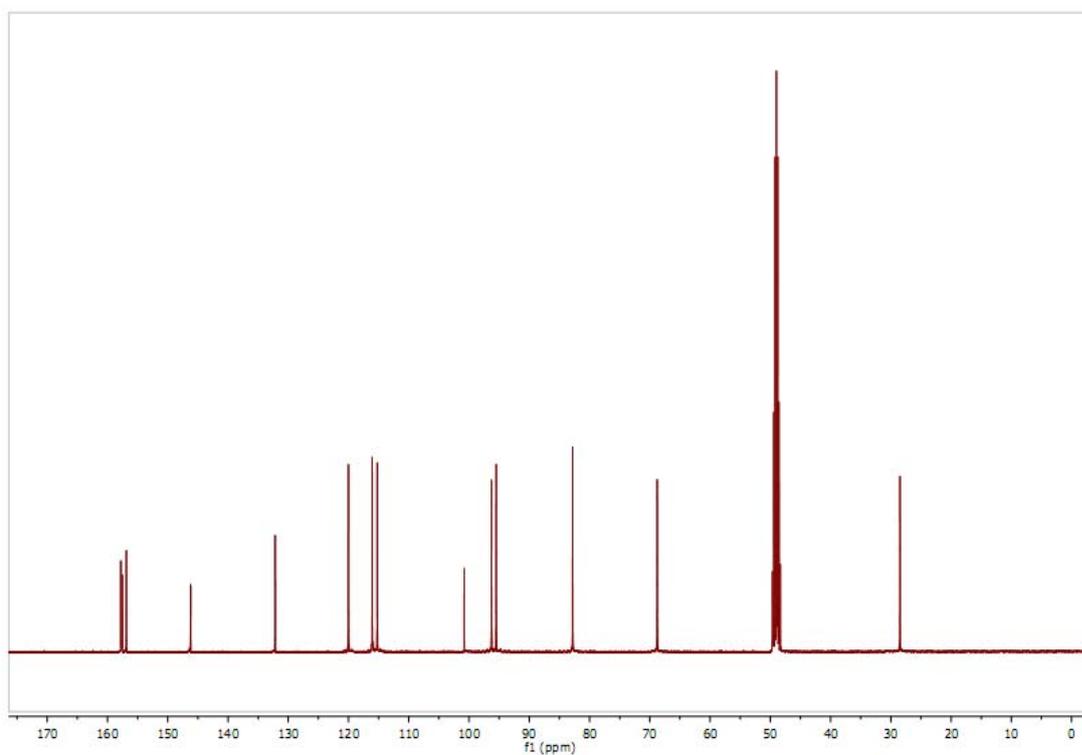


Figura 4.4 – Espectros de RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) de (-)-catequina