

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

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE
***Aristolochia esperanzae*O. KTZE**
E *Ocotea odorifera*(VELL) ROHWER
NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE
***Lactuca sativa*L. E *Raphanus sativus*L.**

ANA BEATRIZ GATTI

São Carlos - S.P.
Brasil
2003

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE
***Aristolochia esperanzae*O. KTZE**
E *Ocotea odorifera*(VELL) ROHWER
NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE
***Lactuca sativa*L. E *Raphanus sativus*L.**

ANA BEATRIZ GATTI

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

ORIENTADORA:

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

CO-ORIENTADORA:

PROF^a. DR^a MARIA INÊS SALGUEIRO LIMA

São Carlos - S.P.
Brasil
2003

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

G263aa

Gatti, Ana Beatriz.

Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia
esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na
germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus
sativus* L. / Ana Beatriz Gatti. -- São Carlos : UFSCar, 2004.
148 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2003.

1. Fisiologia vegetal. 2. Alelopatia. 3. Germinação. 4.
Crescimento. 5. Análise cromatográfica. I. Título.

CDD: 581.1 (20^a)

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

PROF^a. DR^a MARIA INÊS SALGUEIRO LIMA

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”
(Francisco Cândido Xavier)*

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

Ao Rodrigo por todo carinho e felicidade de estarmos juntos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a valiosa contribuição de várias pessoas, às quais expresso minha sincera gratidão:

Às professoras Sonia Cristina J.G. de A. Perez e Maria Inês S. Lima, pelas quais tenho grande admiração e o imenso prazer de termos trabalhado juntas. Agradeço pela orientação e oportunidade, pelos ensinamentos e conversas sempre tão agradáveis, e principalmente pela amizade e carinho que sempre me deram.

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

Ao Rodrigo por todo o carinho e amor tão especial, pelo sorriso sempre e pela ajuda incansável, em tudo no trabalho (textos, fotos, programas....) e em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a crescer, participar e me incentivar sempre, pelo cuidado e principalmente pelos momentos felizes de todos estes anos.

Ao doutorando Djalma (Dep. Química) pela ajuda na realização das análises químicas, por todo o seu cuidado e atenção em ensinar as técnicas de cromatografia e os “ensinamentos químicos” e pelas correções finais; obrigada juntamente a sua esposa Patrícia pela ajuda.

Ao Prof. Paulo Cesar Vieira (Dep. Química) pela oportunidade e uso do laboratório de Produtos Naturais.

Aos Professores Dr. Carlos Alberto R. Diniz, Alberto Peret e Marco Batalha pela orientação nas ‘penosas’ análises estatísticas.

Aos amigos do laboratório de Botânica: Rosangela, Gisele, Letícia, Fernando, Regis, Glaucia, Silmara, Eugênio, Carlão, Maristela, Cris, Paula, Celso, Manoela que sempre presentes com um sorriso amigo, sempre dispostos a ajudar, sempre sinceros e que fazem deste lugar um ambiente tão agradável de trabalho. Agradeço em especial a Rosangela pelo carinho e pelas conversas, pela amizade tão bonita e sincera, a ajuda e atenção sempre. A Gi sempre com seu carinho, alegria e

disposição a toda hora. A Lê pela amizade e lembrança tão carinhosa. Ao Regis pelo bom humor, as brincadeiras e pela disponibilidade de ajuda em todos os momentos, e empréstimo dos livros de estatística.

Agradeço a Marcia por toda a sua disposição e ajuda, pelos desabafos e conversas, além da amizade desde os primeiros dias do mestrado. Obrigada pelo carinho de irmã e amizade tão especial. Além da “adoção” tão carinhosa da Wilma, Joseph, Marcelo e Maurício.

Aos técnicos Carlos Casali, Ademir de Paula e Seu Luis do Dep de Botânica e ao Zé Roberto (Fisiologia) pelo apoio durante o desenvolvimento do todo o trabalho, por nos ajudarem e ensinarem sempre com grande satisfação e alegria. A Dona Tereza pelas tardes mais agradáveis com chás, pipocas e café. As secretárias Joice, Lurdinha e Aline pela colaboração, ajuda e amizade.

Aos funcionários da secretaria do PPGERN, Renata, Roseli, João e Eduardo pelo auxílio e pelas orientações.

Aos amigos do PPGERN, pelos ótimos momentos durante as disciplinas e nas festas, obrigada pelo carinho, em especial da Bernardete, Rachel e Wallace, ao Armando pelas cervejas, enfim por toda amizade e apoio.

Ao Roberto, Suzana, Carol e Danilo pelos cuidados mesmo de longe e por compreender a ‘nossa’ ausência em muitos momentos.

Ao pessoal da república dos Cachassauros Largados, em especial ao Tonho pela paciência e compreensão sempre que foi preciso trabalhar até mais tarde, utilizando o computador.

Às professoras doutoras participantes do exame de qualificação Maria Ines Salgueiro Lima, Mariângela Tambelini e Silmara C. Fanti pelas sugestões e correções cuidadosas. Aos professores doutores Terezinha de Jesus Deléo Rodrigues, Maria Ines Salgueiro Lima, Mariangela Tambelini e Carlos Henrique B.A. Prado por aceitarem o convite para participar da banca examinadora final e colaborar prestativamente para realização deste trabalho.

À empresa “HORTEC Sementes Ltda” pela doação das sementes de alface e rabanete utilizadas nos bioensaios.

À empresa “AMAFIBRA/SOCOCO” Ltda pela doação da fibra de coco utilizada nos bioensaios de crescimento.

Ao Centro Nacional de Pesquisa - CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim sou imensamente grata a minha família, amigos e aqueles que contribuíram anonimamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	12
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS	13
CAPÍTULO 1	14
A - ALELOPATIA	15
Histórico	15
Conceito	15
Competição × Alelopatia	17
Natureza dos compostos alelopáticos	18
Liberação dos aleloquímicos	19
Atuação dos aleloquímicos	20
Fatores que alteram a liberação dos aleloquímicos	21
Comunidades naturais	22
Sistemas Agrícolas	23
Métodos utilizados em pesquisa sobre alelopatia	25
Testes biológicos	25
Análise química	26
Referências	31
B - TESTES PRELIMINARES: ALELOPATIA DE ESPÉCIES COLETADAS EM ÁREAS DE CERRADO	40
Introdução	40
Considerações sobre as espécies	41
Materiais e Métodos	44
Preparação dos Extratos	44
Rendimento	44
Bioensaio de Germinação	45
Características Físico-Químicas dos Extratos	46
Resultados e Discussão	48
Rendimento	48
Bioensaio de Germinação	49
Características Físico-Químicas dos Extratos	51
Conclusão	53
Referências	54

CAPÍTULO 2	57
"ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Aristolochia esperanzae</i> O. KTZE NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>Lactuca Sativa</i> L E <i>Raphanus sativus</i>L."	
Resumo	58
Abstract	59
Introdução	60
Considerações sobre a espécie	62
Objetivos	63
Materiais e Métodos	64
Preparação dos Extratos	64
Rendimento	64
Bioensaio de Germinação	65
Bioensaio de Crescimento	66
Análise Química	68
Características Físico-Químicas dos Extratos	72
Resultados e Discussão	74
Rendimento	74
Bioensaio de Germinação	75
Bioensaio de Crescimento	79
Análise química	91
Características Físico-Químicas dos Extratos	96
Conclusões	98
Referências	99
CAPÍTULO 3	104
"ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Ocotea odorifera</i> (VELL) ROHWER NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> L. E <i>Raphanus sativus</i>L."	
Resumo	105
Abstract	106
Introdução	107
Objetivo	109
Considerações sobre a espécie	109
Materiais e Métodos	112
Preparação dos Extratos	112
Bioensaio de Germinação	113
Bioensaio de Crescimento	114
Características Físico-Químicas dos Extratos	116
Resultados e Discussão	118
Rendimento	118
Bioensaio de Germinação	118
Bioensaio de Crescimento	123
Características Físico-Químicas dos Extratos	135
Conclusões	137
Referências	138
CONCLUSÃO GERAL	142
APÊNDICE	144

Índice de Figuras

Figura 1 - Rendimento de <i>Anemopargna arvensis</i> , <i>Aristolochia esperanzae</i> , <i>Bacharis dracunculifolia</i> , <i>Casearia sylvestris</i> , <i>Drymis brasiliensis</i> , <i>Memora peregrina</i> , <i>Ocotea odorifera</i> , <i>Palicourea rígida</i> , <i>Peritassa campestris</i>	48
Figura 2 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) submetidas à ação dos extratos <i>A. arvensis</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>B. dracunculifolia</i> , <i>C. sylvestris</i> , <i>D. brasiliensis</i> , <i>M. peregrina</i> , <i>O. odorifera</i> , <i>P. rígida</i> , <i>P. campestris</i>	49
Figura 3 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) submetidas à ação dos extratos <i>A. arvensis</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>B. dracunculifolia</i> , <i>C. sylvestris</i> , <i>D. brasiliensis</i> , <i>M. peregrina</i> , <i>O. odorifera</i> , <i>P. rígida</i> , <i>P. campestris</i>	50
Figura 4 - <i>Aristolochia esperanzae</i> com flor. (Foto: Ortolan, R.L.).	62
Figura 5 - Folha da <i>Aristolochia esperanzae</i> . (Foto: Ortolan, R.L.).	62
Figura 6 - Detalhe do fruto da <i>Aristolochia esperanzae</i> (aberto e fechado).(Foto: Ortolan, R.L.).....	63
Figura 7 - Esquema com os fracionamentos no extrato aquoso de folhas de <i>A. esperanzae</i>	71
Figura 8 - Rendimento dos extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto de <i>A. esperanzae</i>	74
Figura 9 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) submetidas à ação dos extratos de <i>Aristolochia esperanzae</i>	76
Figura 10 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) submetidas à ação dos extratos de <i>Aristolochia esperanzae</i>	78
Figura 11 - Porcentagem de plântulas anormais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) e rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) quando crescidas em papel de filtro e fibra de coco umedecidos com extratos de folha, raiz e caule de <i>Aristolochia esperanzae</i>	81
Figura 12 - Anormalidade de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i>) quando crescidas em papel de filtro ou fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i> . (Foto: Ortolan, R.L.).....	82
Figura 13 - Anormalidade de plântulas de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) quando crescidas em papel de filtro ou fibra de coco, umedecidos com extratos <i>A. esperanzae</i> . (Foto: Ortolan, R.L.).....	83
Figura 14 - Altura de plântulas normais e anormais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i>	84

Figura 15 - Comprimento radicular de plântulas normais e anormais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos <i>A. esperanzae</i>	85
Figura 16 - Massa seca total de plântulas normais e anormais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i>	86
Figura 17 - Altura das plântulas normais e anormais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i>	87
Figura 18 - Comprimento radicular de plântulas normais e anormais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i>	88
Figura 19 - Massa seca total de plântulas normais e anormais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>A. esperanzae</i>	89
Figura 20 - Germinação de sementes de alface (<i>L. sativa</i>) quando colocadas na presença das frações obtidas do primeiro fracionamento (líquido-líquido). (Foto: Lima, M.I.S.)	91
Figura 21 - Germinação de sementes de alface (<i>L. sativa</i>) quando colocadas na presença das frações obtidas do segundo fracionamento (cr. por adsorção). (Foto: Lima, M.I.S.).....	93
Figura 22 - Germinação de sementes de alface (<i>L. sativa</i>) quando colocadas na presença das frações obtidas do terceiro fracionamento (cr. por exclusão). (Foto: Ortolan, R.L.)	94
Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H, obtido para a fração E 11-16 de <i>Aristolochia esperanzae</i>	95
Figura 24 - Árvore de <i>Ocotea odorifera</i> . (Foto: Ortolan, R.L.)	110
Figura 25 - Detalhe das folhas de <i>Ocotea odorifera</i> . (Foto: Ortolan, R.L.).....	111
Figura 26 - Detalhe dos frutos de <i>Ocotea odorifera</i> . (Foto: Ortolan, R.L.)	111
Figura 27 - Rendimento dos extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto de <i>O. odorifera</i>	118
Figura 28 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) submetidas à ação dos extratos de <i>Ocotea odorifera</i>	120
Figura 29 - Porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) submetidas à ação dos extratos de <i>Ocotea odorifera</i>	122
Figura 30 - Plântulas normais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) quando crescidas em fibra de coco umedecida com extratos de folha, raiz e caule de <i>Ocotea odorifera</i> em duas concentrações (50 e 100%) e com água (controle). (Foto: Casali, C.A.).....	125

Figura 31 - Crescimento de plântulas normais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) quando crescidas em papel de filtro umedecido com extratos de <i>O. odorifera</i> . (Foto: Casali, C.A.).....	126
Figura 32 - Plântulas normais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) quando crescidas em fibra de coco umedecida com extratos de <i>O. odorifera</i> . (Foto: Casali, C.A.).....	127
Figura 33 - Plântulas normais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) quando crescidas em papel de filtro umedecido com extratos de <i>O. odorifera</i> . (Foto: Casali, C.A.).....	128
Figura 34 - Altura de plântulas normais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos <i>O. odorifera</i>	129
Figura 35 - Comprimento radicular de plântulas normais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>O. odorifera</i>	130
Figura 36 - Massa seca total de plântulas normais de alface (<i>Lactuca sativa</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>O. odorifera</i>	131
Figura 37 - Altura das plântulas normais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com os extratos de <i>O. odorifera</i>	132
Figura 38 - Comprimento radicular de plântulas normais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>O. odorifera</i>	133
Figura 39 - Massa seca total de plântulas normais de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com extratos de <i>O. odorifera</i>	134

Apêndice

Figura I - Esquema dos mecanismos cromatográficos de a: absorção; b: partição; c: troca iônica; d: bioafinidade; e: exclusão. (Fonte: Collins, <i>et al.</i> , 1990).	144
Figura II - Esquema de uma coluna de adsorção. a: reservatório; b; fase móvel; c: coluna de vidro; e: chumaço de algodão; f: frasco coletor; g: amostra; h: camada de areia ou de recheio, colocada após a aplicação da amostra. (Fonte: Collins, <i>et al.</i> , 1990).	145
Figura III - Eluição de três compostos em uma mistura na cromatografia por adsorção. a: mistura no topo da coluna; b: início da separação; c: separação completa de um dos componentes. (Fonte: Collins, <i>et al.</i> , 1990).	146
Figura IV - Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão. (Fonte: Collins, <i>et al.</i> , 1990).	146
Figura V – Mapas de distribuição geográfica de <i>Aristolochia esperanzae</i> (esquerda) (modificado de Capellari, 1991) e <i>Ocotea odorifera</i> (direita) (modificado de Capellari, 1991, segundo Lorenzi, 2002).	147

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Análise de variância para porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*L. sativa*) submetidas à ação dos extratos de *A. esperanzae*..... 75

Tabela 2 - Análise de variância de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*R. sativus*) submetidas à ação dos extratos de *A. esperanzae* 75

Tabela 3 - Análise de variância para parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de alface (*L. sativa*) submetidas à ação dos extratos de *A. esperanzae*. 79

Tabela 4 - Análise de variância para os parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de rabanete (*R. sativus*) submetidas à ação dos extratos de *A. esperanzae*. 79

Tabela 5 - Análise de variância para porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*L. sativa*) submetidas à ação dos extratos *O. odorifera*119

Tabela 6 - Análise de variância para porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*R. sativus*) submetidas à ação dos extratos de *O. odorifera*.119

Tabela 7 - Análise de variância para parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de alface (*L. sativa*) submetidas à ação dos extratos de *O. odorifera*123

Tabela 8 - Análise de variância para parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de rabanete (*R. sativus*) submetidas à ação dos extratos de *O. odorifera*.124

Apêndice

Tabela I - Série gradual de eluentes. (Fonte: Collins, *et al.* , 1990).145

Abreviaturas e Símbolos Utilizados

ϕ - Diâmetro.

ANOVA - Análise de variância.

CCD - Cromatografia de Camada Delgada.

h = altura.

mOsm/Kg - unidade de concentração osmótica.

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

pH - Potencial hidrogeniônico.

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

T_{abs} - Temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

CAPÍTULO 1

ALELOPATIA

E

TESTES PRELIMINARES:

“ALELOPATIA DE ESPÉCIES COLETADAS EM ÁREAS DE CERRADO”

*“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”
Cora Coralina*

A - Alelopatia

Histórico

O primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de outras plantas vizinhas foi descrito por Theophrastus (300 A.C.) um discípulo de Aristóteles, que propôs que a leguminosa *Cicer arietinum* exauria o solo. Em 1832, o botânico De Candolle sugeriu que o cansaço da terra na agricultura era decorrente de exudatos liberados pelas plantas da própria cultura (Rice, 1984).

Lee e Monsi (1963) citados por Almeida (1988) referem-se a um documento japonês de autoria de Banzan Kumazawa, escrito a cerca de 300 anos, no qual descreve que a chuva e o orvalho arrastavam para o solo produtos químicos contidos nas folhas de pinheiro (*Pinus densiflora*), os quais prejudicavam as culturas localizadas embaixo da copa destas árvores.

Hoy e Stickney (1881) citados por Chou (1999) reportaram que uma espécie de noqueira afetava o crescimento de plantas situadas ao seu redor. Schreiner e Reed (1907; 1908) também citados por Chou (1999) identificaram no solo um ácido orgânico que era liberado pelas raízes de plantas que inibiam o crescimento de algumas culturas.

Conceito

Somente em 1937, o pesquisador alemão Hans Molisch estudou o efeito do etileno no crescimento das plantas e cunhou a palavra "alelopatia", proveniente da união de duas palavras gregas "allelon" e "pathos", que significam respectivamente "mútuo" e "prejuízo". Apesar do significado etimológico da palavra alelopatia, Molisch define que o termo engloba tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais entre uma planta e outra (Einhellig, 1995).

Rice (1974) na primeira edição de seu livro, "Allelopathy", limita o termo alelopatia como sendo apenas uma interação prejudicial. Putnan e Duke (1978) consideram que o termo alelopatia talvez seja tecnicamente errôneo, uma vez que significaria somente 'prejuízo mútuo'. No entanto, Rice (1984) na segunda edição de

seu livro com o mesmo título, revisou seu conceito e abrangeu a definição original do termo, o qual inclui também o efeito benéfico.

Ao termo alelopátia ainda vem sendo acrescentados conceitos como os criados por Grummer (1955) citado por Einhellig (1995) que sugerem uma classificação de interações de acordo com a natureza dos agentes doador e receptor das substâncias químicas, propondo então os termos: antibiótico – para substâncias produzidas por microrganismos e que afetam outros microrganismos; marasminos – para os compostos produzidos por plantas superiores e que atuam em microrganismos; fitocidas – para os elaborados por microrganismos e que atuam nas plantas e colinos – quando o doador e o receptor são plantas.

Recentemente, Fuerst e Putnan (1983) reclassificaram estes termos em: fitoinibidores – como sendo as substâncias alelopáticas produzidas por plantas superiores e que inibem outras plantas (substituindo colino) e saproinibidores – as de origem microbiana e tóxicas para plantas superiores (substituindo fitocidas).

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

Em 1971 Wittaker e Feeny cunharam o termo aleloquímico (allelochemicals) como sendo agentes químicos de importância essencial para a adaptação de espécies e organização das comunidades. Chou e Waller (1983) usaram aleloquímica (allelochemicals) para descrever todas as interações bioquímicas entre organismos tanto inter quanto intra-especificamente (Chou, 1999).

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

Recentemente, Miller (1996) classificou o efeito alelopático em dois tipos: autotoxicidade, que ocorre quando plantas de uma espécie liberam compostos químicos que interferem na germinação e/ou crescimento de plantas da mesma

espécie; e heterotoxicidade, quando uma planta produz substâncias que são tóxicas para germinação e/ou crescimento de plantas de outras espécies.

O processo de autotoxicidade vem sendo observado tanto em ambientes naturais como em ecossistemas manipulados, causando inúmeras implicações, tanto ecológicas como econômicas, como declínio de produções agrícolas e problemas na regeneração de algumas áreas naturais.

Segundo Singh *et al.* (1999) as espécies que possuem o mecanismo de autotoxicidade podem regular suas populações no espaço e no tempo, evitando competição intra-específica, favorecendo sua própria perpetuação e tendo uma melhor distribuição geográfica. No entanto, não há evidência que estas espécies sejam favorecidas pela seleção natural. Várias espécies de coníferas são exemplos de espécies que possuem o mecanismo de autotoxicidade.

Para Seigler (1996) o processo de autotoxicidade tem a função positiva de manter espaçamento entre indivíduos para prevenir o desenvolvimento de predadores, de bactérias ou fungos patogênicos, assim como promover a polinização cruzada entre indivíduos.

Competição ´ Alelopatia

Em uma comunidade natural diversos mecanismos ecológicos acontecem concomitantemente, e devido à complexidade que envolve estes mecanismos torna-se difícil distingui-los. Este fato, não é diferente quanto aos processos de alelopatia e competição, tanto que alguns autores preferem defini-los conjuntamente através do termo "interferência".

No entanto, é importante distinguir os processos de alelopatia e de competição, que são considerados mecanismos opostos, uma vez que a competição acontece pela retirada ou redução de fatores (como água, luz, nutrientes), e a alelopatia acontece pela introdução ou liberação de elementos no ambiente.

Fuerst e Putnam (1983), Liu e Lovett (1993) e Weidenhamer (1996), Inderjit, (1997), Inderjit e Mallik (2002) vêm desenvolvendo trabalhos que propõem metodologias que possam diferenciar ou separar os processos de alelopatia e competição.

Natureza dos compostos alelopáticos

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

Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são produtos secundários produzidos pelas plantas e são chamados de aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou apenas produtos secundários.

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

Um dos principais questionamentos na alelopatia é se os aleloquímicos são produzidos pela planta com função específica ou se são simples subprodutos do metabolismo celular das plantas. Autores citados por Pires e Oliveira (2001) como Muller e Whittaker defendem que as substâncias com atividade alelopática se encontram em maior quantidade nos vacúolos das células das plantas onde ficariam depositadas a fim de evitar sua própria autotoxicidade. Swain, citado por Pires e Oliveira (2001) também defende que os aleloquímicos são produzidos com função específica e assim, sua síntese obedece a leis definidas geneticamente.

Rice (1984) propôs um agrupamento dos compostos químicos que possuem atividade alelopáticas em (14) categorias, de acordo com suas próprias vias de síntese. Estes compostos incluem as principais classes de quinonas, fenóis, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos, esteróides, alcalóides, entre outras.

Fischer (1991) demonstrou que a ação alelopática muitas vezes, deriva dos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Fato comprovado também por outros autores como Halligan (1975), Asakawa *et al.* (1980), Bhatt e Sabata (1989), Fischer *et al.* (1989 e 1990), Hiradate (1999), Macias *et al.* (2000), Nishimura *et al.*, (2000) e Goto *et al.*, (2001).

Além dos estudos com terpenos, já foram descritas outras classes de compostos secundários com atividade alelopática como os fenóis (McPherson *et al.*, 1971; Tang e Young, 1982; Pellissier, 1994; Inderjit, 1996; Huang *et al.*, 2000; Quayyum *et al.*, 2000; Olofsdotter, 2002; Singh *et al.*, 2003), alcalóides (Wu *et al.*, 1997; Aerts *et al.*, 1991), taninos (Rice e Pancholy, 1974; Rawat *et al.*, 1998), entre outros.

Liberação dos aleloquímicos

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

A volatilização é comum em plantas aromáticas e os aleloquímicos volatilizados são de difícil detecção ou identificação. Geralmente, destacam-se os terpenos, etileno, entre outros. Estes compostos podem ser facilmente liberados pelas folhas ou outras partes da planta e podem afetar diretamente o crescimento ou desenvolvimento de plantas que se encontram próximas. Segundo Durigan e Almeida (1993) diversas espécies de *Salvia*, *Eucalyptus* e *Artemisia* elaboram produtos voláteis tóxicos como o canfeno, dipenteno, α -pineno e β -pineno que inibem o desenvolvimento de outras plantas.

Segundo Souza (1988) citado por Corrêa (1996) as fitotoxinas voláteis podem ser absorvidas diretamente pela cutícula das plantas vizinhas, na forma de vapores ou serem condensadas pelo orvalho. Ao chegarem ao solo podem ser absorvidas pelas raízes, adsorvidas pelas partículas e/ou se dissolverem no solo.

O processo de lixiviação consiste na remoção de substâncias químicas das plantas vizinhas pela ação da água através da chuva, orvalho ou neblina. No solo estas substâncias podem sofrer degradação ou ação de microrganismos.

A exudação radicular tem sido pouco estudada, mas é muito importante especialmente quando associada ao efeito de microrganismos no solo, que podem ter efeito direto com as raízes de outras plantas ou simplesmente ficar acumulada no solo. (Robson, 1972 citado por Reigosa *et al.*, 1999).

O processo de decomposição de produtos vegetais é decorrente do rompimento de tecidos de células ou extravasamento de conteúdo celular. No entanto, a atividade destes produtos no solo é normalmente transitória, uma vez que

está sujeita à adsorção pelos colóides, degradação, inativação ou transformação pelos microrganismos (Almeida, 1988).

Além da atividade proveniente de compostos simplesmente liberados pelas plantas, os quais não sofrem qualquer transformação, sempre há a possibilidade de microrganismos modificarem compostos não tóxicos para tóxicos, como no caso da 'amedalina' em resíduos de pêssigo (Rice, 1984). Também para o mesmo autor, é possível que microrganismos sintetizem inibidores, como na produção da substância 'patulina' pelo microrganismo *Penicillium urticae* que cresce em resíduo de palha de trigo (*Triticum aestivum*). Essas mudanças podem acrescentar uma nova forma de atuação dos aleloquímicos de uma planta.

Atuação dos aleloquímicos

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

Einhellig (1986 e 1995) propõe um modelo hipotético para explicar a ação dos aleloquímicos fenólicos nas plantas. Segundo este autor, o modelo pode ser aplicado aos demais aleloquímicos e sintetiza o modo de atuação destas substâncias nas plantas. De acordo com este modelo, a atuação dos aleloquímicos começa com as alterações nas membranas celulares, o que conseqüentemente acarretaria alterações na disponibilidade de água e íons, seguido das funções dos estômatos, com mudanças nas taxas de respiração e de fotossíntese, além da síntese protéica e de pigmentos. Todas estas mudanças afetariam diretamente a divisão celular culminando na inibição do desenvolvimento e crescimento das plantas. Segundo Einhellig, no entanto, é preciso mais trabalhos que comprovem

certamente qual a seqüência da ação dos aleloquímicos nas plantas diante da grande variabilidade dos compostos alelopáticos.

Para Einhelling (1996) a inibição tipicamente alelopática resulta da ação combinada de grupos de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos. Entretanto, muitos trabalhos propõem o isolamento do aleloquímico e o estudo sobre sua atuação direta nas plantas. Cameron e Julian (citados por Einhellig, 1995) acharam que 50 μM de ácido cinâmico e ferúlico reduziram a síntese protéica em plântulas de alface. Monoterpenos voláteis, principalmente o cineole e a cânfora reduziram a divisão celular e resultaram no aumento do diâmetro das células radiculares, provocando uma desorganização no núcleo celular de várias espécies (Gross, 1975).

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

Fatores que alteram a liberação dos aleloquímicos

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

Einhelling (1996) enfatiza, através de um modelo triangular, que condições ambientais (ou seja, estresse) modificam a taxa de produção dos aleloquímicos, e podem aumentar a concentração destes compostos, e assim proporcionar uma maior inibição nas plantas receptoras, o que se caracteriza por um importante mecanismo de defesa das plantas.

Rice (1984) observou que dias longos aumentam a concentração de ácidos fenólicos e terpenos em muitas espécies de plantas. Observou também que a deficiência de diversos minerais (boro, cálcio, magnésio, fósforo, nitrogênio ou

enxofre) causou um aumento da concentração de ácido clorogênico e escopoletina em muitas plantas.

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

Comunidades naturais

A influência dos processos alelopáticos em ecossistemas naturais iniciou-se com o estudo de Booth (1941) citado por Almeida (1988) sobre a regeneração de terrenos agrícolas abandonados, onde o autor observou que o processo de regeneração consistia de quatro fases: ervas pioneiras, gramíneas anuais, gramíneas perenes e savana. O desaparecimento rápido das plantas do primeiro para o segundo estágio de desenvolvimento era devido à produção, pelas espécies pioneiras, de substâncias alelopáticas de toxicidade inter e intraespecífica.

Outro exemplo clássico de atuação dos aleloquímicos sobre comunidades naturais foi realizado por Muller (1966) citado por Rice (1984), onde eram formadas vastas áreas de *Salvia leucophylla* e *Artemisia californica* impedindo o estabelecimento de outras espécies a uma distância de dois metros, e somente a partir de seis a dez metros a vegetação normal voltava a se estabelecer.

Jackson e Willemsen (1976) em seus trabalhos com *Ambrosia artemisiifolia* indicaram que as mudanças vegetacionais de sucessão, do primeiro para o segundo estágio, poderiam estar associadas parcialmente com atividade alelopática através dos compostos encontrados como os ácidos fenólicos, incluindo o caféico e o clorogênico.

Segundo Chou (1986 e 1999) a alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico, que influencia a dominância e sucessão de plantas, formação de comunidades, vegetação clímax e manejo.

Esta interação alelopática, responsável pelo estabelecimento e sobrevivência de certas espécies no meio ambiente, é feita através de um mecanismo de defesa e ataque das plantas, que vem sendo adquirido ao longo de um processo de evolução (Nishimura e Mizutani, 1995).

Seigler (1996) sugere que o processo de coevolução possa ter relação com os compostos metabólicos pela habilidade de algumas plantas conseguirem se desintoxicar ou metabolizá-los.

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

Outra atuação dos aleloquímicos, que também pode influenciar a composição natural das comunidades foi descrita por Einhellig (1995), o qual sugere que o fato de certas sementes permanecerem viáveis por muitos anos no solo pode estar associado à presença de aleloquímicos nas cascas ou em outros tecidos destas sementes e através deles, consigam deter a ação microbiana e sua deterioração.

Peres *et al.* (1998) também sugerem que a liberação de aleloquímicos por uma espécie doadora pode alterar as estratégias de germinação de uma espécie receptora, uma vez que este aleloquímico pode quebrar a dormência das sementes que permaneceriam no banco de sementes no solo para germinação posterior. Este caso foi comprovado, por estes autores, estudando o efeito alelopático de extratos obtidos de *Gleichenia pectinata* em três estações do ano, e utilizados na germinação de *Clidemia hirta*, onde a porcentagem de germinação destas sementes foi estatisticamente maior que o controle utilizando extratos obtidos de materiais coletados na primavera e no outono.

Sistemas Agrícolas

Na agricultura, há anos se conhece o problema do “cansaço da terra” e a ele era inferido apenas a infertilidade da mesma ou a competição entre espécies. Recentemente, estudos comprovam que a esse problema está associado muitas vezes o processo alelopático.

O primeiro trabalho científico a comprovar a atividade alelopática nas culturas foi o de Schreiner e Sullivan (1969, citados por Almeida, 1988) quando demonstraram que a redução do desenvolvimento no cultivo de feijões miúdos (*Vigna unguiculata*) era devido a uma substância química produzida pela própria

espécie, pois uma vez retirada do solo, após diversas culturas, o feijão voltava a se desenvolver normalmente.

A partir deste e outros trabalhos, os estudos vem se intensificando na agricultura, com relação a alelopatia e principalmente, com a atividade alelopática das ervas daninhas (Young e Bartholomew, 1981; Coelho, 1986; Vidal 1986), das culturas ou espécies sobre as ervas daninhas (Magalhães e Franco, 1962; Almeida e Rodrigues, 1985; Rodrigues, *et al.* 1992), alelopatia entre culturas (Peters *et al.*, 1982; Almeida e Rodrigues, 1985), e outros estudos direcionados para as produções agrícolas (autores citados por Almeida, 1988 e Rodrigues *et al.*, 1992).

Santos *et al.* (2002) estudaram o efeito de cascas de arroz e café sobre o desenvolvimento de caruru-da-mancha (*Amaranthus viridis*), uma planta infestante das lavouras cafeeiras, e observaram que cascas de arroz propiciaram uma diminuição na velocidade e porcentagem de emergência, enquanto que as cascas de café proporcionaram um estímulo no crescimento das plântulas, e a medida que a concentração deste extrato aumentou, a velocidade de emergência também foi aumentada, identificando que a presença das cascas de café pode induzir o aumento da infestação pelo caruru-da-mancha.

Vaccarini e Bonetto (2000) indicam que a ação seletiva de alguns aleloquímicos, como o 'witanolides' extraído da espécie *Lochroma australe*, possibilita a utilização destes compostos como herbicidas naturais contra espécies de ervas daninhas, uma vez que esta substância por exemplo, não inibiu a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* e reduziu o crescimento de *Sorghum hapelense* e *Chenopodium album*.

Além disso, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais através da alelopatia com o manejo de ervas daninhas, através da rotação de culturas, sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, adubação verde, além de sistemas agroecológicos (Baruah *et al.*, 1994; Weston, 1996; Chou *et al.*, 1998; Rodrigues e Rodrigues, 1999; Wu *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002; Kato-Noguchi, 2003).

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

patógenos de culturas e insetos, além de aleloquímicos já isolados que combatem espécies de ervas daninhas.

Métodos utilizados em pesquisa sobre aleopatia

Testes biológicos

Para constatar a ação alelopática os bioensaios têm uma grande importância, pois através deles se consegue controlar alguns parâmetros (temperatura, disponibilidade de água, etc.) para investigar os mecanismos que estão interagindo.

A germinação de sementes é o parâmetro mais utilizado nos bioensaios de alelopatia (Rice, 1984). Nestes testes de germinação deve ser considerado o número de sementes por parcela, onde o número ideal pode impedir que ocorra o processo de contaminação entre as sementes em desenvolvimento, além de impedir também o processo de competição quando em desenvolvimento (Brasil, 1992). Além disso, Weidenhamer (1996) reporta que os resultados de alelopatia são influenciados pelo número de sementes, pois isso implica na relação de volume disponibilizado para cada uma delas.

A resposta do crescimento das plântulas é bastante utilizada para também provar os efeitos alelopáticos em laboratório, e assim ajudar a conhecer as características fisiológicas e bioquímicas que envolvem os mecanismos de ação alelopática. O alongamento da radícula foi apontado por alguns autores, como sendo um dos indicativos mais sensíveis nas respostas de crescimento de plântulas receptoras (Jacobi e Ferreira, 1991; Souza Filho *et al.*, 1997; Miró *et al.*, 1998; Fagioli *et al.*, 2000).

Segundo Souza (citado por Abreu, 1997 em comunicação pessoal) são de essencial importância as medições de pH e potencial osmótico dos extratos nos bioensaios de alelopatia. Para o mesmo autor, o potencial osmótico pode atrasar, reduzir ou mesmo impedir a germinação das sementes e também afetar o estabelecimento das plântulas, quando em altas concentrações. Segundo Rutherford e Powrie (1993) baixos valores de potenciais osmóticos, associados a valores de pH próximos do neutro, são ideais para a germinação de sementes.

Souza Filho *et al.* (1996 e 1999) e Miró *et al.* (1998) realizaram testes biológicos, paralelamente aos ensaios de alelopatia, com soluções de potenciais

osmóticos conhecidos com o intuito de discriminar a interferência do potencial osmótico na inibição puramente alelopática. Estes autores utilizaram o Polietinoglicol (PEG-6000) para preparar as soluções com potenciais osmóticos conhecidos.

Segundo Lowrey *et al.* citados por Pires *et al.*, (2001) após os bioensaios, a extração dos compostos secundários é imprescindível para a identificação e quantificação dos alelopáticos, no qual se utiliza técnica analítica elaborada.

Para Inderjit e Dakshini (1995) a utilização de solventes orgânicos, diferente da água deve ser evitada, por não serem encontrados naturalmente interagindo nos processos alelopáticos. Além disso, em condições de campo, um grande número de compostos orgânicos também pode ser lixiviado no solo ou decomposto por microrganismos, sendo assim necessário cuidado com os experimentos que se realizam em laboratórios (Rodrigues *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos nos experimentos devem ser inseridos num contexto mais geral para que não se crie uma distância muito grande entre os ensaios laboratoriais e o ambiente natural (Inderjit e Dakshini, 1995).

Análise química

Cromatografia

De modo geral, as técnicas cromatográficas são aplicadas na química, na bioquímica, na pesquisa científica e na indústria. A cromatografia é amplamente utilizada para separação, identificação ou quantificação de substâncias químicas.

A cromatografia é um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que se encontram em contato íntimo, sendo que uma das fases permanece estacionária (fase estacionária) e outra se move através dela (fase móvel) (Collins *et al.*, 1990).

Existe uma variedade de tipos de cromatografia, sendo sua classificação feita através da técnica utilizada (planar ou em coluna), do mecanismo de separação envolvido (adsorção, partição, troca iônica, bioafinidade ou exclusão), dos diferentes tipos de fases utilizadas (referente aos diversos tipos e estado físico das fases estacionária e móvel), além do método de introdução da amostra e seu subsequente desenvolvimento (eluição, deslocamento e análise frontal).

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Um tratamento prévio adequado da amostra pode economizar muito esforço nas diferentes etapas de isolamento. Quando a amostra vem de uma planta que contém elementos próprios que podem interferir no processo de purificação, um passo simples pode eliminar a maior parte do material não desejado (Hostettmann *et al.*, 2003).

Existem diferentes métodos de preparação que antecedem o processo cromatográfico, sendo que a extração líquido-líquido (ou partição entre solventes), é a forma mais comum de preparação da amostra. A extração dos solutos é feita pela partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente um aquoso e outro orgânico. Os compostos só serão extraídos pela fase orgânica se possuírem a necessária lipofilicidade para serem extraídos pelo solvente orgânico. (Cass e Degani, 2001).

Para grandes volumes são utilizados funis de separação apropriados para a extração líquido-líquido. (Cass e Degani, 2001). Quando se utiliza este método combinado com testes biológicos obtêm-se rapidamente frações enriquecidas com o componente desejado (Hostettmann *et al.*, 2003).

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) é uma cromatografia do tipo planar e consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (Lopes, 1990).

O processo de separação da CCD está fundamentado principalmente no fenômeno da adsorção. Entretanto pode ocorrer também pelo processo de partição ou troca iônica.

Existe uma grande variedade de tipos de adsorventes para fins cromatográficos e entre os mais utilizados estão os de sílica (SiO_2), alumina, celulose e poliamida. No entanto, o adsorvente de sílica (ácido salicílico amorfo) é seguramente um dos adsorventes mais utilizados em cromatografia por adsorção.

De modo geral, a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcalóides e esteróides (Lopes, 1990).

Existem algumas formas diferentes de desenvolvimento (movimento diferencial dos compostos de uma amostra, ao serem deslocados pela fase móvel, em função de sua direção) de um cromatograma. A cromatografia de camada delgada com desenvolvimento ascendente (realizada de baixo para cima) é o método mais utilizado e pode ser considerado como uma técnica padrão.

Geralmente, inicia-se um trabalho de cromatografia com o desenvolvimento unidimensional e ascendente, com fase móvel e adsorvente puro, podendo haver modificações dependendo dos primeiros resultados obtidos.

As cromatoplasmas (placas com as substâncias separadas), após o desenvolvimento, são secas e reveladas. A revelação consiste em tornar visível as substâncias incolores presentes na amostra e pode ser realizada através de métodos físicos (luz ultravioleta), químicos (vapores de iodo, vanilina, tricloreto de antimônio, etc...) e biológicos (através de reações enzimáticas ou bacterianas).

A cromatografia de camada delgada possui a vantagem de ser uma técnica de fácil compreensão, execução e baixo custo, além de conseguir separações em breve espaço de tempo, tem versatilidade e grande reprodutividade.

CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO

A cromatografia por adsorção é a cromatografia na qual se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. (Vichewski, 1990).

Empiricamente, esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples, não exigindo instrumentação muito aperfeiçoada.

A coluna cromatográfica é constituída por um tubo de vidro em posição vertical, sua extremidade superior é aberta e a inferior é afilada terminando em uma torneira, que permitirá o controle da vazão da fase móvel. Na parte superior da coluna adapta-se um recipiente como reservatório da fase móvel e abaixo da

torneira colocam-se recipientes ou frascos coletores de eluentes, onde seu tamanho dependerá do volume a ser coletado.

Os adsorventes (fase estacionária) devem ser escolhidos levando em consideração sua força de adsorver, onde as substâncias eluirão da coluna segundo sua polaridade. As substâncias que podem ser utilizadas como adsorventes podem ser a alumina, a sílica gel, o silicato de magnésio ou carvão ativo.

A função da fase móvel na cromatografia por adsorção tem o sentido de realizar a função de solvente propriamente dita, ou seja, considerar as relações de solubilidade dos compostos da mistura a ser cromatografada. Além disso, possui a função de realizar o desenvolvimento dos componentes da mistura na coluna ou dessorver (libertar uma substância adsorvida) estes componentes do adsorvente, e assim são, ditos eluentes (Vichenevski, 1990).

Os eluentes (fase móvel) são selecionados de acordo com o seu poder de eluição, isto é, aumento de habilidade de dessorver as substâncias. Esta habilidade está relacionada com a polaridade dos eluentes. Sendo assim, para facilitar e agilizar o processo de dessorção é necessário que se utilize uma série gradual de eluentes segundo seu grau de polaridade.

A fase móvel (eluentes), quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, sendo mais rapidamente arrastado quanto mais fracamente o componente estiver adsorvido (Vichenevski, 1990).

Para ocorrer uma completa separação, a fase móvel deve ser fracamente adsorvida pela fase estacionária, não ser afetada quimicamente e possibilitar realmente o desenvolvimento da corrida cromatográfica.

A partir da passagem gradual dos eluentes, são coletadas frações que contem diferentes componentes da mistura, que foram arrastados pelos eluentes, seguidas pela afinidade da polaridade entre o eluente e a substância arrastada. As substâncias eluirão da coluna segundo a sua polaridade.

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

A cromatografia por exclusão promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, e dependentes de

uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado (Rothschild, 1990).

A fase estacionária é constituída por um recheio ou gel que é formado por macromoléculas que possuem ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis.

O espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material, levando ou não, as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das substâncias, variando suas velocidades e assim promovendo a separação (Rothschild, 1990).

De modo geral, existe uma correlação entre o volume no qual a substância é eluída e seu tamanho molecular (ou massa molecular). O funcionamento da cromatografia por exclusão pode ser explicado pelo deslocamento primeiramente das moléculas grandes, ou seja, com maior peso molecular, seguidas então, por moléculas de menor peso molecular (Rothschild, 1990).

Os tipos de géis mais utilizados são os de dextrano (Sephadex), de poliacrilamida (bio-gel) e de agar e agarose. Os géis devem obedecer algumas características como estabilidade, baixo teor de íons, além de conter partículas de tamanho e distribuição controlados.

A cromatografia em gel de exclusão, tal como sephadex, é utilizada freqüentemente como uma etapa de pré-purificação (Hostettman *et al.*, 2003).

Referências

- ABREU, J.C. **Potencial alelopático do angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* L.L Sprg.): efeitos sobre a germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.)**. 1997. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- AERTS, R.J.; SNOEIJER, W.; MEIJDEN, E.V.D.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by cinchona alkaloids? **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2947-2951, 1991.
- ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (Circular IAPAR, 53).
- ASAKAWA, Y.; MATSUDA, R.; TAKEMOTO, T. Mono- and sesquiterpenoids from *Wiesnerella denudata*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 567-569, 1980.
- BHATT, R.K.; SABATA, B.K. A furanoid diterpene glucoside from *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2419-2422, 1989.
- BARUAH, N.C.; SARMA, J.C.; SARMA, S.; SHARMA, R.P. Seed germination and growth inhibitory cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1885-1892, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC - fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.
- CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 57-73.
- CHOU, C.H.; FU, C.Y.; LI, S.Y.; WANG, Y.F. Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 12, p. 2131-2150, 1998.

- CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 609-636, 1999.
- COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 11-28.
- CORRÊA, J.F. **Potencialidades alelopáticas e identificação de algumas substâncias de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad.** 1996. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- DURIGAN, J.C. ; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 28 p.
- EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R. ; TANG, C.S. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 171-188.
- EINHELLIG, F.A. Allelopathy: Current status and future goals. In: INDEJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Ed). **Allelopathy: organisms, processes and applications**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 1-25.
- EINHELLIG, F.A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 886-893, Nov./Dec., 1996.
- FAGIOLI, M.; RODRIGUES, T.J.D.; ALMEIDA, A.R.P.; ALVES, P.L.C.A. Efeito inibitório da *Brachiaria decumbens* STAPF.PRAIN. e *B. brizantha* (HOCHST EXA. RICH.) STAPF. cv marandu sobre a germinação e vigor de sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.). **Boletim da Indústria Animal**, v. 57, n. 2, p. 129-137, 2000.
- FISCHER, N.H.; WEIDENHAMER, J.D.; BRADOW, J.M. Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2315-2317, 1989.
- FISCHER, N.H.; WEIDENHAMER, J.D.; RIOPEL, J.L.; QUIJANO, L.; MENELAOU, M.A. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2479-2483, 1990.

- FISCHER, N.H. Plant terpenoids as allelopathic agents. In: HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A. (Ed.) **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. New York: Oxford Science Publications, 1991. p. 375-398.
- FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, J ; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 629-644.
- FUERST, E.P.; PUTNAM, A.R. Separating the competitive and allelopathic components of interference: theoretical principles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, n. 8, p. 937-944, 1983.
- GOTO, Y.; KOJIMA, Y.; NAKAYAMA, T.; TERAZAWA, M. Allelopathic sesquiterpenoids from rhizomes of *Petasites japonicus* ssp. *giganteus* Kitam. **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 109-113, 2001.
- GROSS, D. Growth regulating substances of plant origin. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2105-2112, 1975.
- HALL, A.B.; BLUM, U.; FITES, R.C. Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. DEBRIS on seed germination. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 5, p. 776-783, 1982.
- HALLIGAN, J.P. Toxic terpenes from *Artemisia californica*. **Ecology**, v. 56, p. 999-1003, 1975.
- HARBORNE, J.B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A. (Ed.). **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. New York: Oxford Science Publications, 1991. p. 399-426.
- HARBORNE, J.B. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M.J. (Ed.). **Plant ecology**. Blackwell Science, 1997. p.132-155.
- HIRADATE, S.; YADA, H.; ISHII, T.; NAKAJIMA, N.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SUGIE, H.; ZUNGSONTIPORN, S.; FUJII, Y. Three plant growth inhibiting saponins from *Duranta repens*. **Phytochemistry**, v. 52, n.7, p. 1223-1228, 1999.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUSFCar, 2003. 152 p.

- HUANG, Z.; LIAO, L.; WANG, S.; CAO, G. Allelopathy of phenolics from decomposing stump-roots in replant Chinese fir woodland. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2211-2219, 2000.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 187-202, Apr.-Jun., 1996.
- INDERJIT. In separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, v. 63, n. 3, p. 221-230, July-Sep., 1997.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, n. 1, p. 28-44, Jan.-Mar., 1995.
- INDERJIT; MALLIK, A.U. Can *Kalmia angustifolia* interference to black spruce (*Picea mariana*) be explained by allelopathy? **Forest Ecology and Management**, v. 160, p. 75-84, 2002.
- JACKSON, J.R.; WILLEMSSEN, R.W. Allelopathy in the first stages of secondary succession on the piedmont of New Jersey. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 7, p. 1015-1023, 1976.
- JACOBI, U.S.; FERREIRA, A.G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 935-943, jul., 1991.
- JUAN JIMÉNEZ-OSORNIO, F.M.V.Z.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides*. L. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 1996.
- KATO-NOGUCHI, H. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 419-423, 2003.
- KHAN, Z.R.; HASSANALI, A.; OVERHOLT, W.; KHAMIS, T.; HOOPER, A.M.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Control of witchweed *Striga hermonthica* by intercropping with *Desmodium* spp., and the mechanism defined as allelopathic. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 9, Sept., 2002.
- KONG, C; HU, F.; XU, X. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Ageratum conyzoides* under stress. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 6, June, 2002.

- LOPES, J.L.C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 45-58.
- LIU, D.L.; LOVETT, J.V. Biologically active secondary metabolites of barley. I. developing techniques and assessing allelopathy in barley. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 10, p. 2217-2230, 1993.
- MACIAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. Potential allelopathic activity of natural plant heliannanes: a proposal of absolute configuration and nomenclature. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2173-2186, 2000.
- McPHERSON, J. K.; CHOU, C.H.; MULLER, C.H. Allelopathic constituents of the chaparral shrub *Adenostoma fasciculatum*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 12, p. 2925-2933, 1971.
- MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 854-859, Nov./Dec., 1996.
- MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1261-1270, ago., 1998.
- NISHIMURA, H ; MIZUTANI, J. Identification of allelochemicals in *Eucalyptus citriodora* and *Polygonum sachalinense*. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Ed.) **Allelopathy - organisms, processes and applications**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 74-85.
- NISHIMURA, H.; KONDO, Y.; NAGASAKA, T.; SATOH, A. Allelochemicals in chicory and utilization in processed foods. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2233-2241, 2000.
- OLOFSDOTTER, M.; REBULANAN, M.; MADRID, A.; DALI, W.; NAVAREZ, D.; OLK, D.C. Why phenolic acids are unlikely primary allelochemicals in rice. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 1, p. 229-242, 2002.
- PELLISSIER, F. Effect of phenolic compounds in humus on the natural regeneration of spruce. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 865-867, 1994.

- PERES, M.T.L.P.; PIZZOLATTI, M.G.; QUEIROZ, M.H.; YUNES, R.A. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (PR.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 131-137, fev., 1998.
- PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA FILHO, I.A.; OLIVEIRA JR, R.S.; FARIA, T.C.L. Atividade alelopática da Leucena sobre espécies da plantas daninhas. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 61-65, jan./mar., 2001.
- PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA, JR, R.S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. (Coord.). Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p. 145-185,
- PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review Phytopathol**, v. 16, p. 431-451, 1978.
- PUTNAM, A.R. ; TANG, C.S. Allelopathy: state of the science. In: _____. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 1-19
- QUAYYUM, H.A.; MALLIK, A.U.; LEACH, D.M.; GOTTARDO, C. Growth inhibitory effects of nutgrass (*Cyperus rotundus*) on rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2221-2231, 2000.
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 13-23, 1998.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.
- RICE, E. L.; PANCHOLY, S.K. Inhibition of nitrification by climax ecosystems. III. Inhibitors other than tannins. **American Journal of Botany**, v. 61, n. 10, p. 1095-1103, 1974.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1974. 353 p.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984. 423 p.
- RIZVI, S.J.H.; TAHIR, M.; RIZVI, V.; KOHLI, R.K.; ANSARI, A. Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 773-796, 1999.

- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ- UNESP/FUNEP, 1992. 18 p. (Boletim).
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Alelopatia e adubação verde. In: AMBROSANO, E. (Coord.). **Agricultura ecológica**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1999. p. 93-107.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 95-116.
- RUTHERFORD, M.C.; POWRIE, L.W. Allelochemic control of biomass allocation in interaction shrub species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 5, p. 893-906, 1993.
- SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F.; MENDES, A.N.G; MORAIS, A.R.; CONCEIÇÃO; H.E.O.; MARINHO, J.T.S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 783-790, jun., 2002.
- SEIGLER, D. S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 876-885, Nov./Dec., 1996.
- SINGH, H.P.; BATISH, J.K.; PANDHER, J.K.; KOHLI, R.K. Autotoxicity: concept, organisms, and ecological significance. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 757-772, 1999.
- SINGH, H.P.; BATISH, J.K.; PANDHER, J.K.; KOHLI, R.K. Assessment of allelopathic properties of *Parthenium hysterophorus* residues. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 95, p. 537-541, 2003.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta Daninha**, v. 14, n. 2, p. 93-101, 1996.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 165-170, fev., 1997.

- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. Effects of aqueous extracts of *Leucaena* on germination and radicle elongation of tree forage grasses. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. (Ed.). **Recent advances in allelopathy - a science of the future**. Cadiz, Espanha: Servicio de Publicaciones-Universidad de Cádiz, 1999. p.391-395.
- TANG, C.S.; YOUNG, C.C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of *Bigalita* limpogress (*Hemarthria altissima*). **Plant Physiology**, v. 69, p. 155-160, 1982.
- VACCARINI, C.E.; PALACIOS, S.M.; MERAGELMAN, K.M.; SOSA, V.E. Phytogrowth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 227-230, 1999.
- VACCARINI, C.E.; BONETTO, G.M. Selective phytotoxic activity of withanolides from *lochroma australe* to crop and weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2187-2196, 2000.
- VICHENEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 59-70.
- VILES, R.N.; REESE, R.N. Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, n. 1, p. 39-43, 1996.
- WEIDENHAMER, J.D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 866-875, Nov./Dec., 1996.
- WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 860-866, Nov./Dec., 1996.
- WU, Y.C.; CHAO, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, Y.Y. Alkaloids from *Cassutha filiformis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 181-184, 1997.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2141-2154, 2000.

- YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1031-1032, 1995.
- YAMADA, K.; ANAI, T.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationship of lepidimoide and its analogues. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 671-673, 1996.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-2, 1998.

B - TESTES PRELIMINARES: ALELOPATIA DE ESPÉCIES COLETADAS EM ÁREAS DE CERRADO

Introdução

O cerrado possui uma grande riqueza de espécies vegetais, muitas delas consideradas endêmicas (Eiten, 1990 citado por Silva, 1997). A vegetação do cerrado brasileiro está classificada como uma das mais ricas e ameaçadas do mundo (Mittermeyer *et al.* citado por Felfili, 2002). Esta ameaça é decorrente da intensa ocupação destas áreas pela invasão urbana e pela agricultura.

O estado de São Paulo, até o início do século XX, mantinha intocada boa parte de sua cobertura vegetal original, dentre as vegetações, o cerrado ocupava a maior área, correspondendo a 14% da área do estado (São Paulo, 1997 citado por Durigan, 2002).

Hoje restam pequenos fragmentos que, segundo Kronka *et al.*, (1998) correspondem a 2.379 km², ou seja, menos de 1% da superfície do Estado, sendo que desta área, pequena parte se encontra protegida na forma de unidades de conservação.

Diante da rápida redução das áreas de cerrado, essencialmente no estado de São Paulo, é de grande importância o estudo referente à diversidade de espécies presente neste bioma.

Kronka *et al.* (1998) propõe o estabelecimento de uma política de reflorestamento das áreas de cerrado do estado de São Paulo, através de alternativas como as de repovoamento pelo banco de sementes e replantio de espécies nativas que já são cultivadas.

Sendo assim, além do conhecimento das espécies do cerrado, a informação sobre as interações ecológicas nestas áreas também é muito importante. E entre estas se destaca o processo das relações alelopáticas, uma vez que podem interferir no estabelecimento e inibição da germinação ou crescimento de indivíduos intra ou interespecificamente.

Borghetti e Pessoa (1997) estudaram o processo de alelopátia de uma espécie comum nos cerrados, a lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) e concluíram que esta espécie possui atividade autotóxica sobre seus indivíduos e sobre a

germinação de uma outra espécie, o cosmos (*Cosmos sulphureus*). Esta inibição se dá através de compostos químicos presentes nas sementes de lobeira. Os autores indicam que estas substâncias são eventualmente lixiviadas para o meio e atuam negativamente na germinação e desenvolvimento de outras espécies, alterando a dominância do banco de sementes e/ou de plântulas do ambiente.

Considerando a necessidade de estudos em áreas de cerrado, foi realizado um teste preliminar com algumas espécies, para verificar suas possíveis atividades alelopáticas sobre a germinação de alface e rabanete. As espécies utilizadas foram *Anemopaegna arvensis*, *Aristolochia esperanzae*, *Baccharis dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Ocotea odorifera*, *Palicourea rígida*, *Peritassa campestris*. A partir dos resultados obtidos, optou-se pela escolha de duas espécies que foram estudadas mais detalhadamente nos próximos capítulos.

Considerações sobre as espécies

***Anemopaegna arvensis* (Veel) Stelfeld. (Bignoniaceae)**

Subarbusto de até 60 cm. Folhas opostas, compostas trifoliadas, curto-pecioladas a sésseis, limbo com 0,3 a 10 cm de comprimento e 0,1 a 1,8 cm de largura, linear a elíptico linear. Flores zigomorfas, cálice gamosépalo, corola creme com tubo amarelo. Conhecida popularmente por Catuaba. (Almeida, *et al.*, 1998).

***Aristolochia esperanzae* O. Ktze. (Aristolochiaceae)**

Planta herbácea, rastejante ou trepadeira, com folhas alternadas membranosas orbiculares-reniformes, glabras, flor com perianto formando um grande papo encimado por tubo bilabiado, de cor marron-avermelhados mesclados com outras cores mais claras. A flor exala odor de carne podre que atrai insetos. Conhecida popularmente por papo-de-peru, cachimbo-de turco, mil-homens e jarrinha (Ferri, 1969).

***Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)**

Planta perene, arbustiva, muito ramificada, ramos pilosos. Folhas alternadas, sem pecíolo, membranáceas, uninérveas, lanceoladas, densamente pontuada de glândulas, medindo 1,0 a 3,0 cm de comprimento e 3,0 a 5,0 cm de largura. Inflorescências axilares, em capítulos contendo flores femininas ou contendo flores de ambos os sexos. Chamada popularmente por alecrim-do-campo. (Lorenzi, 1998).

***Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae)**

Arbusto ou árvore hermafrodita de até 10 m, muito ramificada, possuindo ramos cilíndricos e lenticelados. Possui folhas alternadas, simples, pecioladas, limbo cartáceo, ápice agudo a rostrado, nervura sulcada na face ventral e elevada na dorsal, nervuras secundárias de até cinco pares. As flores medem cerca de 2 mm de comprimento. Recebe nome popular de guaçatonga (Almeida *et al.*, 1998). Segundo Backes e Irgang (2002) é uma espécie pioneira e importante na regeneração de ecossistemas, seus frutos são consumidos pela avifauna, a suas flores são visitadas por insetos, principalmente por abelhas, considerada uma das poucas espécies melíferas do inverno. Para os mesmos autores, esta espécie é conhecida também por chá-de-bugre, erva-de-bugre, carvalinho e porangaba.

***Drymis brasiliensis* Miers. (Winteraceae)**

Altura de 4 a 8 m, com tronco de 30 a 40 cm de diâmetro. Folhas simples, glabras, de coloração verde mais clara na face inferior, medindo de 8 a 12 cm de comprimento e de 2 a 3 cm de largura. Conhecida popularmente por casca-d'anta, cataia ou canela amarga. (Lorenzi, 2002). Segundo Backes e Irgang (2002) é uma espécie pioneira distribuída em quase todo território brasileiro.

***Memora peregrina* (Miers) Sandwith. (Bignoniaceae)**

Planta perene, arbustiva, lenhosa chega a medir 1 metro de comprimento, possui caule glabro estriado e com muitas lenticelas. As folhas desta espécie são opostas e compostas com 5 a 7 folíolos lanceolados subcoriáceos e glabros em ambas as faces, estes medem de 5.5 a 7.5 cm de comprimento por 1.0 a 2.5 cm de largura. Inflorescência constituída de muitas flores amarelas vistosas com corola tubulosa de aproximadamente 5.0 cm (Urbanetz, 2002).

***Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer. (Lauraceae)**

Árvore de 15 a 25 m de altura, com tronco de 50 a 70 cm de diâmetro. Copa densa e arredondada. folhas de 7 a 14 cm de comprimento. Todas as partes da planta apresentam cheiro característico pela presença de óleo essencial, o safrol. Popularmente conhecida por canela-sassafrás, sassafrás, sassafrás-amarelo, canela parda, canela cheirosa (Lorenzi, 2002). Segundo Backes e Irgang (2002) o safrol é um óleo volátil, que foi muito extraído para utilização na perfumaria e fabricação de inseticidas e herbicidas. Segundo os mesmos autores, esta espécie é frutífera para macacos, pássaros e roedores, possuindo importância também em projetos de regeneração.

***Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae)**

Arbusto pequeno com ramos aéreos partindo de uma base subterrânea, com folhas duras, coriáceas, grandes, de nervura saliente na face inferior. Possui folhas opostas, sendo que a face superior é verde escura e inferior verde amarelada, as flores são amarelas, pequenas e tubulosas. Conhecida popularmente por douradinha ou gritadeira. (Ferri, 1969).

***Peritassa campestris* (Cambess) A.C. Smith (Hippocrataceae)**

Arbusto baixo e lenhoso, que possui casca lisa, folhas quase sempre alternadas com formato lanceolado-oblongas ou elípticas e textura coriácea, medindo até 15 cm de comprimento. As flores desta espécie são esverdeadas, e seus frutos são do tipo drupa de cor amarelo-alaranjado e são comestíveis. (Corrêa, 1984).

Materiais e Métodos

Preparação dos Extratos

O material vegetal das espécies, com exceção da *Aristolochia esperanzae*, foi coletado nas áreas de cerrado pertencentes à Universidade Federal de São Carlos, no mês de abril de 2002.

O material vegetal foi coletado e mantido congelado até a realização dos experimentos. Os extratos aquosos das plantas foram realizados utilizando-se folha das espécies para os bioensaios de germinação.

Para a obtenção dos extratos, os materiais vegetais foram primeiramente pesados, picados e em seguida, triturados com o auxílio de um liquidificador industrial durante cinco minutos, e deixados descansar durante 30 minutos. Decorrido este período, o extrato foi filtrado em filtro de pano e em seguida utilizou-se uma bomba elétrica a vácuo acoplada a um funil de Buchner recoberto com papel de filtro quantitativo para uma segunda filtragem. O material filtrado foi recolhido em um frasco e depois utilizado.

Todos os extratos foram feitos obedecendo à proporção de 100 g de material vegetal para 300 mL de água destilada, sendo este considerado o extrato bruto, com 100% de concentração.

Nos biensaios de germinação foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L, cultivar Grand rapids) e de rabanete (*Raphanus sativus* L, cultivar Crimson gigante). As sementes foram doadas pela empresa "Hortec Sementes Ltda", com validade de junho de 2005 para as sementes de alface e de junho de 2004 para rabanete.

Rendimento

De cada extrato calculou-se o rendimento utilizado nos experimentos de germinação. Para tal, antes de adicionar cada extrato nas placas de Petri as folhas de papel de filtro foram pesadas (Peso I). Após ter adicionado 5 mL dos extratos nas placas e evaporados durante 12 horas, os papéis de filtro foram novamente pesados (Peso II), em balança analítica de precisão (mg) (Aquila, 2000). A diferença entre as

pesagens (Peso II - Peso I) dividido pelo volume utilizado mostra o rendimento de cada extrato (mg/ml), ou seja, quanto de material vegetal proveniente dos extratos foi necessário para inibir a germinação de 30 sementes de alface ou rabanete. O rendimento total de cada extrato foi calculado através da média aritmética de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

Para este experimento foram utilizados extratos de folha de todas as espécies citadas, na concentração de 100%, além da montagem de placas com água destilada, que foi considerada o grupo controle.

Por se tratar de um teste preliminar, optou-se apenas pela coleta de folhas das espécies, pois segundo Moreira (citado por Paranhos, 1999), a concentração de aleloquímicos é maior nas folhas, seguido do caule, das flores e por último das raízes. Uma vez aparecendo atividade alelopática nas folhas das espécies estudadas, pode-se fazer um estudo mais detalhado para confirmar se esta atividade também aparece nos demais órgãos.

Em cada placa foi colocado 5 mL dos extratos vegetais em duas folhas de papel de filtro que forravam as placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Em seguida, as placas contendo os papéis de filtro, umedecidos com extrato, foram secos em capela com exaustor durante 12 horas. Decorrido este período, o papel de filtro foi reumedecido com 4,5 mL de água destilada.

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 30 sementes de alface ou rabanete por placa de Petri, mantidos em câmara climatizada (Estufa BOD) à 24°C, na ausência de luz. As sementes receberam luz apenas durante as contagens que foram realizadas em intervalos de 12 horas durante os sete primeiros dias e em intervalos de 24 horas até totalizar 10 dias após a semeadura.

Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (Brasil, 1992). A porcentagem (G) e a velocidade (V) e tempo médio (t) de germinação foram calculadas segundo as fórmulas (eq. 1.1, 1.2 e 1.3 respectivamente) citadas em Labouriau e Valadares (1976):

- Porcentagem de germinação

$$G (\%) = (N/A) \times 100 \quad \text{eq. 1.1}$$

onde:

G = porcentagem de germinação

N = número de sementes germinadas

A = número total de sementes colocadas para germinar

- Velocidade de germinação

$$V = 1/t \quad \text{eq. 1.2}$$

onde:

V = velocidade média de germinação (dias⁻¹)

t = tempo médio de germinação

onde:

$$t = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \quad \text{eq. 1.3}$$

onde: n_i = número de sementes germinadas por dia

t_i = tempo de incubação (12 h / 24 h)

Análise estatística dos dados

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

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

As leituras de pH e potencial osmótico foram realizadas com os extratos de *Anemopargna arvensis*, *Aristolochia esperanzae*, *Bacharis dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Ocotea odorifera*, *Palicourea rígida*, *Peritassa campestris* que foram utilizados no bioensaio de germinação. Todos os extratos obedeceram à proporção de 100 g de material vegetal + 300 mL de água

destilada. A leitura do pH de cada extrato utilizado no bioensaio foi medido com o auxílio do pHmetro.

b) Potencial osmótico

A medição da concentração molar foi realizada com um osmômetro (μ Osmotte, modelo 5004 automatic osmometer) onde foram utilizados 50 μ l de cada extrato mantido a temperatura de 24°C e as medidas foram expressas em mOsm/Kg.

Os valores de concentração molar foram convertidos para pressão osmótica a 24°C através da conversão de mOsm/Kg para MPa (equação 1.4, citada por Larcher, 2000):

$$1 \text{ Osmol/Kg} = 0,00832 \times T_{\text{abs}} \text{ MPa} \quad \text{eq.1.4}$$

onde:

T_{abs} - Temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

c) Experimento com PEG

Para a determinação dos efeitos do potencial osmótico, realizou-se um experimento utilizando soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) com diferentes valores de potencial osmótico: 0, -0.2, -0.3 e -0.4 MPa, segundo especificações de Villela (1991). Neste experimento foram colocadas para germinar 30 sementes de alface e rabanete para cada repetição e mantidas a 24°C.

Resultados e Discussão

Rendimento

Diante dos valores obtidos de rendimento dos extratos das espécies estudadas, pode-se observar que o extrato de *C. sylvestris* apresentou maior valor (48.1 mg/mL), seguido do extrato de *P. campestris* (38.3 mg/mL). Os demais apresentaram rendimento variando entre 18 e 30 mg/mL. (Figura 1). Estes valores são relativamente baixos, se comparados com os obtidos por Aquila (2000), que variaram entre 98 e 192 mg/mL. No entanto, mesmo apresentando baixo rendimento estes extratos apresentaram atividade alelopática.

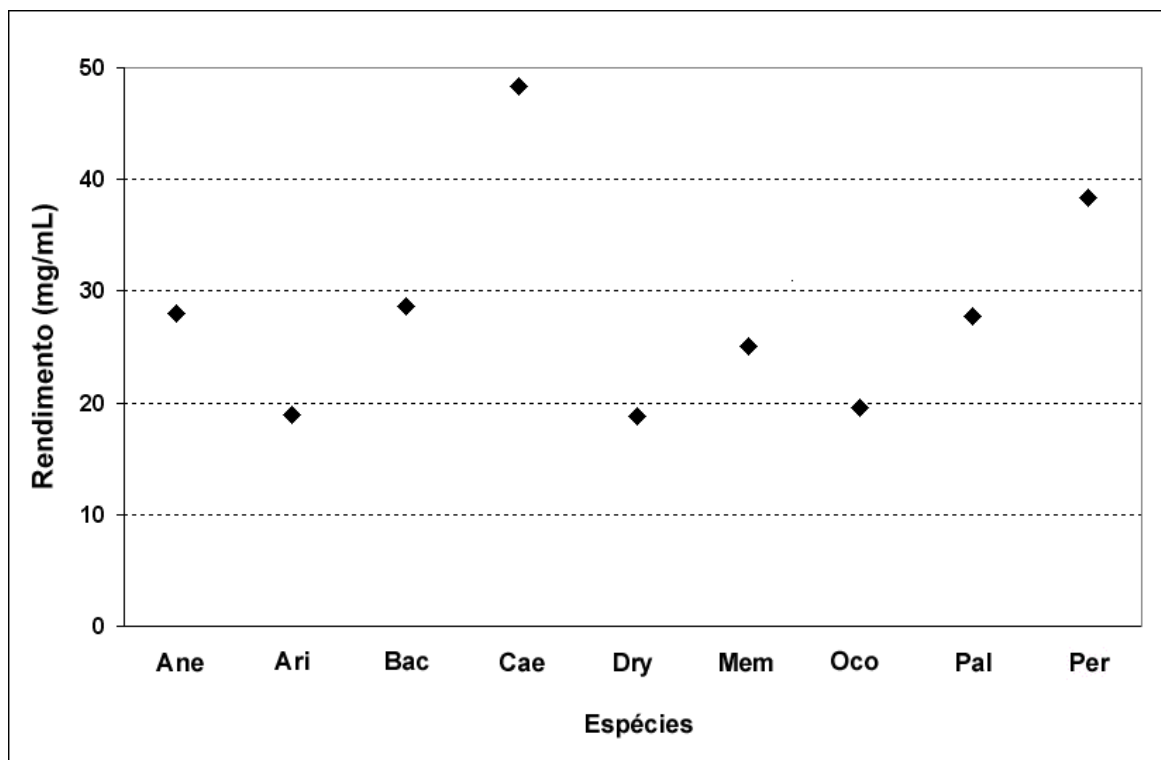


Figura 1 - Valores médios de quantidade de material vegetal obtido de 5 mL dos extratos de folhas de *Anemopargna arvensis* (Ane), *Aristolochia esperanzae* (Ari), *Bacharis dracunculifolia* (Bac), *Casearia sylvestris* (Cae), *Drymis brasiliensis* (Dry), *Memora peregrina* (Mem), *Ocotea odorifera* (Oco), *Palicourea rígida* (Pal), *Peritassa campestris* (Per). Média de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

Diante dos resultados de germinação de alface (Figura 2) e rabanete (Figura 3) em meio contendo os extratos aquosos de *A. arvensis*, *A. esperanzae*, *B. dracunculifolia*, *C. sylvestris*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*, *P. rígida*, *P. campestris*, pode-se observar que todos reduziram e atrasaram a germinação das sementes de alface.

Os extratos que mais inibiram a germinação foram o extrato de *B. dracunculifolia* seguido pelo extrato de *A. esperanzae*, onde foram encontrados os menores valores de porcentagem de germinação, 3,74 e 27,2%, respectivamente. Os extratos que mais atrasaram a germinação das sementes de alface também foram os de *B. dracunculifolia* seguido pelo extrato de *A. esperanzae* (Figura 2).

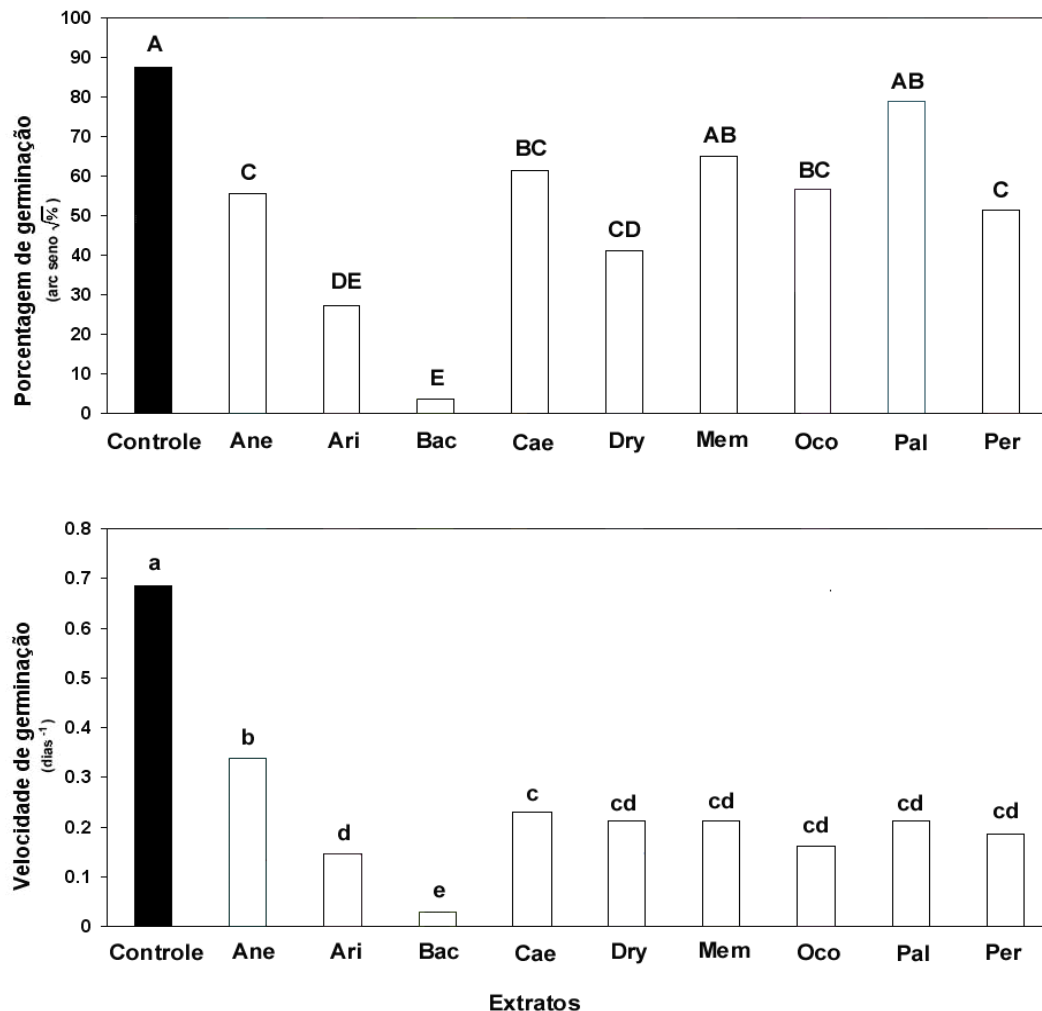


Figura 2 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação dos extratos *A. arvensis*, *A. esperanzae*, *B. dracunculifolia*, *C. sylvestris*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*, *P. rígida*, *P. campestris* na maior concentração (100%), mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir da Figura 3 pode-se observar que todos os extratos diminuíram a porcentagem e reduziram a velocidade de germinação das sementes de rabanete, quando comparadas com o grupo controle. O extrato que mais inibiu a germinação de rabanete foi o de *B. dracunculifolia* seguido dos extratos de *D. brasiliensis* e *O. odorifera*. Os extratos que mais atrasaram a germinação de sementes de rabanete foram os de *M. peregrina*, seguido de *O. odorifera* (Figura 3).

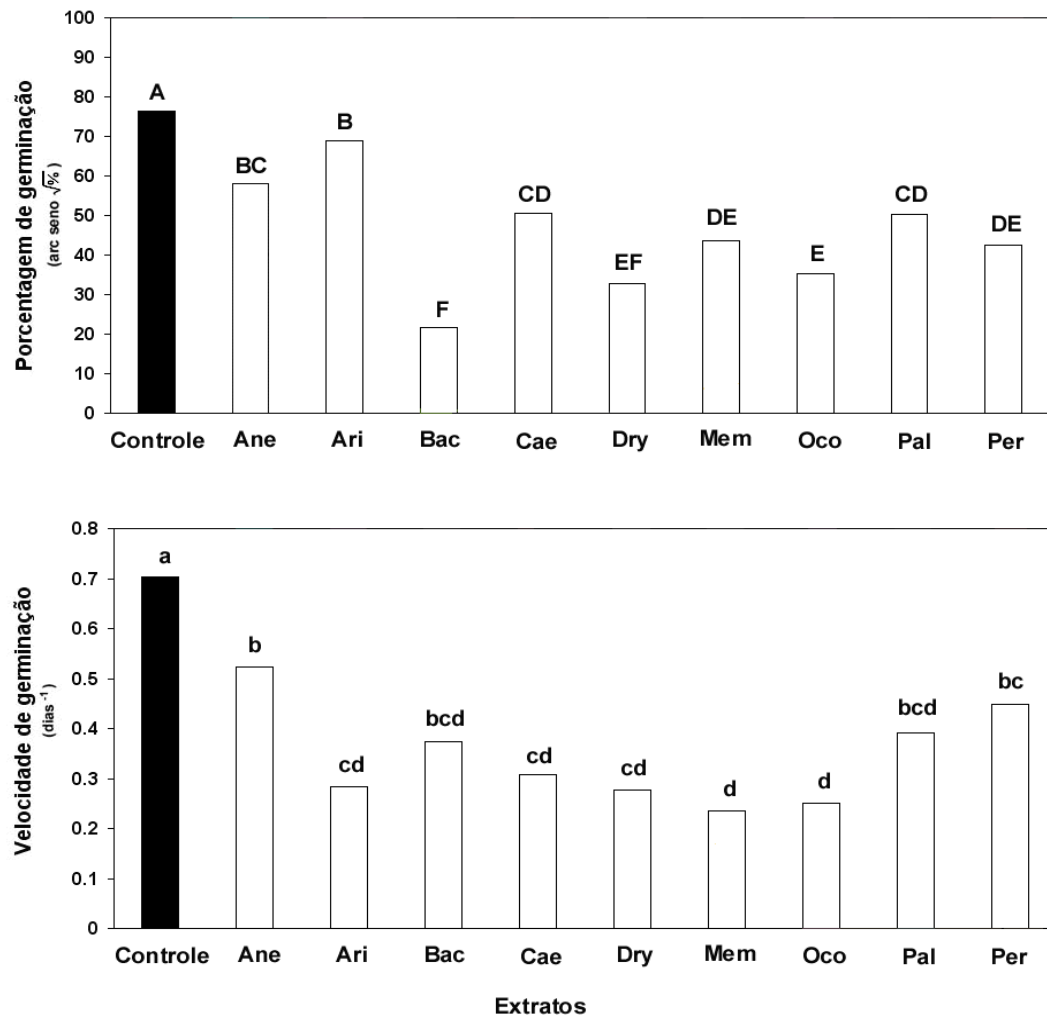


Figura 3 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação dos extratos *A. arvensis* (Ane), *A. esperanzae* (Ari), *B. dracunculifolia* (Bac), *C. sylvestris* (Cae), *D. brasiliensis* (Dry), *M. peregrina* (Mem), *O. odorifera* (Oco), *P. rigida* (Pal), *P. campestris* (Per) na maior concentração (100%), mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

Para os extratos das espécies *Anemopargna arvensis*, *Aristolochia esperanzae*, *Bacharis dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Ocotea odorifera*, *Palicourea rígida*, *Peritassa campestris* foram medidos o pH e seus valores variaram entre 3,6 e 5,83.

Os extratos de *A. arvensis*, *A. esperanzae*, *B. dracunculifolia*, *C. sylvestris*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*, *P. rígida*, *P. campestris* apresentaram respectivamente valores 5.83, 5.1, 4.5, 4.25, 3.6, 5.2, 5.2, 4.2, 5.3 de pH.

Pode-se notar que a maioria dos extratos apresentou baixa acidez, com pH variando entre 5.1 e 5.83. Foram encontrados ainda extratos com pH um pouco mais ácido para as espécies: *D. brasiliensis*, *B. dracunculifolia*, *C. sylvestris*, *P. rígida*.

As medidas de pH encontradas por Abreu (1997) variaram entre 6.0 e 5.2 para extratos provenientes de folhas de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) utilizados na germinação de alface (*Lactuca sativa*) e canafístula (*Peltophorum dubium*). Souza Filho *et al.* (1997) obtiveram valores de pH variando entre 5.23 e 5.74 para extratos da parte aérea de *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis* e *Calopogonium mucunoides*.

b) Potencial osmótico

Os valores de potencial osmótico obtidos para *A. arvensis*, *A. esperanzae*, *C. sylvestris*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*, *P. rígida*, *P. campestris* correspondem respectivamente a 114, 157, 103, 134, 134, 106, 107, 124 mOsm/Kg. Desta forma, os valores variaram entre 103 e 157 mOsm/Kg, o que corresponde a -0.25 e -0.38 MPa, respectivamente para as espécies *C. sylvestris* e *A. esperanzae*.

Do extrato de *B. dracunculifolia* não foi possível realizar a leitura do potencial osmótico, mesmo sendo submetido à leitura por diversas vezes, pois o aparelho não conseguia congelar a substância para realizar o procedimento necessário para a leitura. Possivelmente, o extrato possui alguma substância ou característica física

que impossibilitou a leitura no aparelho, sendo necessário um estudo mais aprofundado para o esclarecimento de tal fato.

c) Experimento com PEG 6000

Quando colocadas para germinar em soluções de PEG-6000, as sementes de alface e rabanete responderam diferentemente uma da outra. Depois de três dias em que as sementes foram colocadas para germinar, observou-se que todas as sementes de rabanete germinaram em todos os potenciais osmóticos. No entanto, 100% das sementes de alface germinaram apenas nos potenciais de 0 (controle) e -0.2 MPa. Nas soluções de -0.3 e -0.4 MPa germinaram 33 e 20% das sementes, respectivamente. Este resultado se manteve até o 7^o dia após a montagem do experimento.

Os potenciais osmóticos obtidos para os extratos das espécies estudadas variaram de -0.25 a -0.38 MPa. Considerando que soluções com potenciais osmóticos abaixo de -0.4 MPa não interferem significativamente na germinação das sementes de rabanete, pode-se inferir que a redução na velocidade e porcentagem de germinação destas sementes (Figura 3) tenha acontecido pela presença de atividade alelopática em todos os extratos, uma vez que seus potenciais osmóticos não ultrapassaram este valor.

Em relação às sementes de alface, além da atividade alelopática pode ter ocorrido também a interferência do potencial osmótico dos extratos, uma vez que todos apresentaram valores menores que -0.2 MPa, a partir do qual não houve germinação de todas as sementes nas soluções de PEG-6000.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste teste preliminar, pode-se concluir que:

- Os extratos aquosos das folhas das espécies *Anemopaegna arvensis*, *Aristolochia esperanzae*, *Bacharis dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Ocotea odorifera*, *Palicourea rígida*, *Peritassa campestris* podem apresentar atividade alelopática na germinação das sementes de alface e rabanete.
- Dentre os extratos que mais diminuíram e atrasaram a germinação de alface e rabanete, encontram-se os de *B. dracunculifolia*, *A. esperanzae*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*.

A partir das conclusões obtidas, optou-se pelas espécies de *Aristolochia esperanzae* e *Ocotea odorifera* para o desenvolvimento dos demais experimentos e estudar mais detalhadamente a atividade alelopática destas espécies. Não foram escolhidas as espécies *B. dracunculifolia* e *M. peregrina* devido à baixa disponibilidade de material vegetal. Além disto, a espécie *D. brasiliensis* já havia sido estudada e comprovada sua atividade alelopática por Gorla e Perez (1997).

Referências

- ABREU, J.C. **Potencial alelopático do angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* L.L. Sprg.): efeitos sobre a germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.)**. 1997. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B. SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado - Espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998. 464 p.
- AQUILA, M.E.A. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, n. 53, p. 51-66, ago., 2000.
- BACKES, P.; IRGANG B. **Árvores do sul: guia de identificação & interesse ecológico**. Vila Flores: Impressora Pallotti, 2002. 316 p.
- BORGHETTI, F.; PESSOA, D.M.A. Autotoxicidade e alelopátia em sementes de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae). In: LEITE, L.L.; SAITO, C.H. (Ed.). **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. Trabalhos selecionados do 3º Congresso de Ecologia do Brasil (1996). Brasília: Universidade de Brasília, 1997. p. 54-58.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CORRÊA, M.P. - **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. I, 233-4, 1984.
- DURIGAN, G; SIQUEIRA, M.F.; FRANCO, G.A.D.C. A vegetação de cerrado no estado de São Paulo. In: ARAÚJO, E.L.; MOURA, A.N; SAMPAIO, E.S.B.; GESTINARI, L.M.S.; TORRES, C.J.M. **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2002. p. 53-54.

- FELFILI, J.M. Padrões de diversidade do cerrado do centro-oeste brasileiro. In: ARAÚJO, E.L.; MOURA, A.N.; SAMPAIO, E.S.B.; GESTINARI, L.M.S.; TORRES, C.J.M. **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2002. p. 58-61.
- FERRI, M.G. **Plantas do Brasil: Espécies do cerrado**. São Paulo: Editora Edgard Blucher; EDUSP, 1969. 239 p.
- KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; PAVÃO, M. **Áreas de domínio do cerrado no estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1998. 84 p.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Editora RiMa, 2000. 531 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, v.1.,1998. 352 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.
- PARANHOS, M.V.; NAGEM, T.J.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, T.T.; QUEIROZ, M.E.L.R. Estudos alelopáticos dos constituintes químicos isolados das raízes de *Himatanthus phagedaenicus* (MART.) WOODSON. **Revista da Pesquisa & Pós-graduação**, ano 1, v. 1, n. 2, p. 5-9, jul/dez., 1999.
- SILVA, D.A.; KLINK, C.A. Crescimento e alocação de biomassa de duas gramíneas nativas do cerrado. In: LEITE, L.L.; SAITO, C.H. (Ed.). **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. Trabalhos selecionados do 3º Congresso de Ecologia do Brasil (1996). Brasília: Universidade de Brasília, 1997. 326 p.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p.165-170, fev., 1997.

URBANETZ, C. **Flora Fanerogâmica da Reserva de Cerrado da UFSCar**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Departamento de Botânica, 2002. Trabalho de Conclusão de Curso.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, nov/dez., 1991.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aristolochia esperanzae* O. KTZE NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Lactuca Sativa* L. E *Raphanus sativus* L.

*“Não sei onde estou indo,
mas sei que estou no meu caminho”*

Raul Seixas

Resumo

(Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.). O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de extratos aquosos de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* na germinação e crescimento de alface e rabanete. Todos os extratos preparados obedeceram à proporção de 100g de material vegetal para 300 mL de água destilada, que produziu o extrato considerado 100% concentrado. A partir deste, foram feitas diluições com água destilada para 75, 50 e 25%. Nos testes de germinação foram avaliados os efeitos dos extratos obtidos de folha, caule, raiz, fruto e flor a 100, 75, 50 e 25%. Para o teste de crescimento foram utilizados extratos de folha, caule e raiz na concentração de 100 e 50%. Nos testes de germinação foram utilizadas quatro repetições de 30 sementes distribuídas em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL dos referidos extratos, secas durante 12 horas e reumedecidas com 4,5 mL de água destilada. No primeiro teste avaliou-se a porcentagem e velocidade de germinação das sementes. No teste de crescimento, as sementes foram previamente germinadas (2-4 mm de radícula) e depois transferidas para caixas plásticas contendo os substratos papel de filtro e fibra de coco umedecidos com os respectivos extratos. Avaliou-se a altura das plântulas, o comprimento radicular, a massa seca das plântulas, e a presença de anormalidades nas plântulas. Os testes foram mantidos a temperatura constante de 27°C. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que os extratos de folha foram os que mais afetaram a porcentagem de germinação e que todos os extratos e as diferentes concentrações retardaram a germinação de sementes de alface e de rabanete. Quanto ao teste de crescimento pode-se verificar que os extratos de caule e raiz causaram anormalidades nas plântulas. As plântulas crescidas no substrato papel de filtro apresentaram maior inibição do crescimento, em relação àquelas crescidas no substrato fibra de coco. A concentração dos extratos foi a principal responsável pelo estímulo ou inibição causada no crescimento das plântulas de alface e rabanete.

Palavras-chave - alelopatia, *Aristolochia*, alface, rabanete.

Abstract

(Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Ktze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L.). The objective of this work was analyze the effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* organs in the germination and early growth of lettuce and radish. All the prepared extracts obeyed the ratio of 100g of plant material + 300 mL of distilled water to produce an extract 100% concentrated. This extract was diluted with distilled water to produce final concentrations of 75, 50 and 25%. In the germination tests the extracts of leaf, stem, root, fruit and flower, with concentration of 100, 75, 50, 25% were evaluated. In the seedlings growth, extracts of leaf, stem and root were used in the concentration of 100 and 50%. In the germination tests, four replicates of 30 seeds were distributed in Petri dishes with two filter paper moistened with 5 mL of the extracts, dried during 12 hours and moistened again with 4,5 mL of distilled water. In the first test, the rate and germination percentage was evaluated. In the growth test, the seeds were previously germinated (2-4mm root length) and transferred to plastic boxes containing the filter paper or coconut fiber, moistened with the extracts. The aerial part height, root length, dry mass and the presence of abnormalities in the seedlings were evaluated. Both tests were maintained at constant temperature (27°C). The obtained results showed that the leaf extracts affected strongly the germination percentage and all the extracts, in different concentrations, delayed the germination of lettuce and radish seeds. In the growth test could be verified that the stem and root extracts caused abnormalities in the seedlings. The seedlings grown in filter paper presented bigger growth inhibition in relation to seedlings from coconut fiber. The extract concentration was the main responsible for the incentive or inhibition caused on lettuce and radish seedlings growth.

Key words - allelopathy, *Aristolochia*, lettuce, radish.

Introdução

Rice (1984) definiu o termo alelopatia como o efeito prejudicial e/ou benéfico entre todos os tipos de plantas através de interações químicas, incluindo os microrganismos.

Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são produtos do metabolismo secundário das plantas, chamados de aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou apenas produtos ou metabólitos secundários. Estas substâncias estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes (Putnam e Tang, 1986).

A ação dos vários aleloquímicos está envolvida na inibição e em modificações nos padrões de crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, por este motivo torna-se difícil sintetizar o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996). No entanto, vários autores listaram inúmeros mecanismos de ação dos aleloquímicos, que afetam vários processos fisiológicos das plantas (Rice, 1984; Einhelling, 1986; Putnam e Tang, 1986; Inderjit e Dakshini, 1995; Chou, 1999; Reigosa, *et al.*, 1999).

A produção de aleloquímicos pelas plantas pode ser regulada por diversos fatores como a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e microrganismos presentes (Chou, 1986). Einhelling (1996) comenta sobre a influência de outros fatores como a da radiação ultravioleta, doenças e ataque de insetos, enfatizando que estas condições modificam diretamente a taxa de produção dos aleloquímicos. Além disso, os fatores relacionados a estresse podem aumentar a atividade biológica referente aos aleloquímicos.

Segundo Einhelling (1996) a inibição tipicamente alelopática, resulta da ação combinada de grupos de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos.

Diante da variedade da atuação dos compostos secundários, principalmente na ação alelopática, Bagchi *et al.* (1997) consideram os aleloquímicos como um recurso para o desenvolvimento de herbicidas naturais ou de um estimulante para o crescimento de algumas plantas. A maioria dos trabalhos relata que os efeitos dos

compostos alelopáticos se relacionam aos processos fisiológicos da planta receptora e de maneira geral, agem como inibidores da germinação e do crescimento (Juan Jiménez-Osornio *et al.*, 1996, Viles e Reese, 1996; Rawat *et al.*, 1998; Vaccarini *et al.*, 1999). Porém, alguns trabalhos demonstraram que estes compostos podem atuar como promotores de crescimento (Hasegawa *in* Yamada *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1995; Yokotani-Tomita *et al.*, 1998). Aparentemente, a maior parte, se não todos os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, são estimulantes quando presentes em menores concentrações, (Rice, 1984).

Segundo Chou (1986 e 1999) a alelopatia tem sido 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. Esta interação alelopática, responsável pelo estabelecimento e sobrevivência de certas espécies no ambiente, é feita por um mecanismo de defesa e ataque das plantas, que vem sendo adquirido ao longo de um processo de evolução (Nishimura e Mizutani, 1995). Além disso, para Reigosa *et al.* (1999) a sucessão pode ser afetada pela alelopatia, permitindo a permanência de espécies como pioneiras graças à liberação de aleloquímicos.

Muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais através da alelopatia com o manejo e o controle das ervas daninhas, por meio da rotação de culturas, sistemas adequados de semeadura entre espécies e entre safras, além de sistemas agroecológicos. (Durigan e Almeida, 1993; Baruah *et al.*, 1994; Weston, 1996; Chou *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002; Kato-Noguchi, 2003).

Para constatar a ação alelopática os bioensaios têm grande importância, pois através deles se consegue controlar alguns parâmetros, como temperatura, disponibilidade de água, e investigar os mecanismos que estão interagindo.

Alguns trabalhos evidenciam a presença de terpenos, diterpenos, lignina, ácido aristolóquio, entre outras substâncias do metabolismo secundário em espécies de *Aristolochia*, incluindo a *esperanzae*. (Priestap, *et al.*, 1971; Lopes *et al.*, 1987; Lopes e Bolzani, 1988; Lopes *et al.*, 1988).

Considerações sobre a espécie

Aristolochia esperanzae O. Ktze, espécie pertencente à família Aristolochiaceae, planta herbácea, rastejante ou trepadeira, com folhas alternadas membranosas orbiculares-reniformes, glabras, estípulas amplas, flor zigomorfa com perianto formando um grande papo encimado por tubo bilabiado, totalmente pintalgada em tons marron-avermelhados mesclados com outras cores mais claras (Figuras 4 e 5). No interior do tubo encontram-se numerosos pêlos. A flor exala odor de carne podre que atrai insetos, possui frutos capsulares septicida 6-valvares (Figura 6). Conhecida popularmente por papo-de-peru, cachimbo-de turco, mil-homens e jarrinha (Ferri, 1969).

Aristolochia esperanzae O. Kuntze é uma espécie pioneira e considerada freqüente nos cerrados do Estado de São Paulo (Capellari, 1991).



Figura 4 - *Aristolochia esperanzae* com flor. (Foto: Ortolan, R.L.).

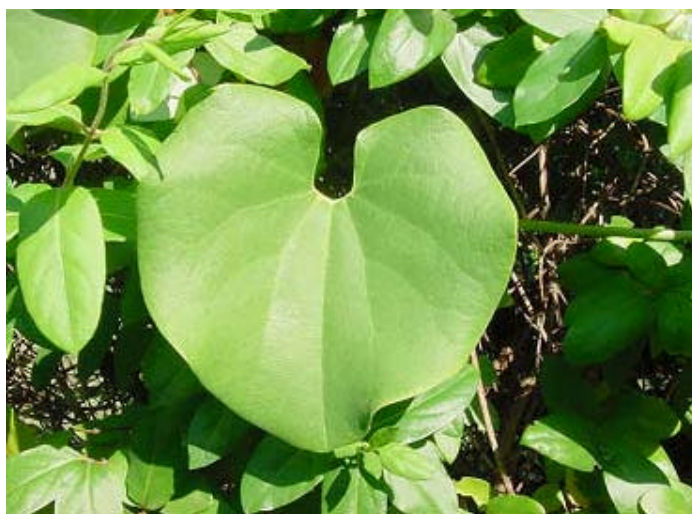


Figura 5 - Folha da *Aristolochia esperanzae*. (Foto: Ortolan, R.L.).



Figura 6 - Detalhe do fruto da *Aristolochia esperanzae* (aberto à esquerda e fechado à direita). (Foto: Ortolan, R.L.)

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade alelopática de diferentes concentrações de extratos de folha, caule, e raiz, fruto e flor de *Aristolochia esperanzae* na germinação e no crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.).

Além disso, avaliou-se a possibilidade de utilização do papel de filtro e da fibra de coco como substratos para avaliação do crescimento de plântulas, sob a ação dos extratos aquosos.

Materiais e Métodos

Preparação dos Extratos

Para a avaliação do potencial alelopático de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze foi coletado material vegetal de populações desta espécie presentes em áreas pertencentes ao *campus* da Universidade Federal de São Carlos.

O material vegetal foi coletado em maio de 2002 e mantido congelado até a realização dos experimentos. Os extratos aquosos da planta foram feitos utilizando-se folha, caule, raiz, fruto e flor para os bioensaios de germinação. Em virtude dos obtidos nos testes de germinação e da disponibilidade de material, optou-se em utilizar apenas extratos de folha, caule e raiz para os testes de crescimento.

Para a obtenção dos extratos, os materiais vegetais foram primeiramente pesados, picados e em seguida, triturados com o auxílio de um liquidificador industrial durante cinco minutos, e deixados descansar durante 30 minutos. Decorrido este período, o extrato foi filtrado em filtro de pano e em seguida utilizou-se uma bomba elétrica a vácuo acoplada a um funil de Buchner recoberto com papel de filtro quantitativo para uma segunda filtragem. O material filtrado foi recolhido em um frasco Kitazato e imediatamente utilizado.

Todos os extratos foram feitos obedecendo à proporção de 100 g de material vegetal para 300 mL de água destilada, sendo este considerado o extrato bruto (100% de concentração). A partir deste, foram feitas diluições com água destilada para 75, 50 e 25 %. O efeito destas quatro concentrações foi comparado com o da água destilada, considerada como controle (0%).

Rendimento

Calculou-se o rendimento de cada extrato de *A. esperanzae* nas concentrações utilizadas nos experimentos de germinação. Para tal, antes de adicionar cada extrato nas placas de Petri as folhas de papel de filtro foram pesadas (Peso I). Após ter adicionado 5 mL dos extratos nas placas e evaporados durante 12 horas, os papéis de filtro foram novamente pesados (Peso II), em balança analítica de precisão (mg) (Aquila, 2000).

A diferença entre as pesagens (Peso II - Peso I) dividido pelo volume utilizado mostra o rendimento de cada extrato (mg/ml), ou seja, quanto de material vegetal proveniente dos extratos foi necessário para inibir a germinação de 30 sementes de alface ou rabanete. O rendimento total de cada extrato foi calculado através da média aritmética de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

Nos biensaios de germinação foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L, cultivar Grand rapids) e de rabanete (*Raphanus sativus* L, cultivar Crimson gigante). As sementes foram doadas pela empresa “Hortec Sementes Ltda”, com validade de junho de 2005 para as sementes de alface e de junho de 2004 para rabanete.

Para este experimento foram utilizados extratos de folha, caule, raiz, fruto e flor em quatro concentrações (25, 50, 75 e 100%) mais o grupo controle. Foram colocados 5 mL dos extratos em duas folhas de papel de filtro que forravam as placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As placas contendo os papéis de filtro, umedecidos com extrato, foram secos em capela com exaustor durante 12 horas. Decorrido este período, o papel de filtro foi reumedecido com 4,5 mL de água destilada.

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 30 sementes de alface ou rabanete por placa de Petri, mantidos em câmara climatizada (Estufa BOD) à 24°C, na ausência de luz. As sementes apenas receberam luz durante as contagens que foram realizadas em intervalos de 12 horas durante os sete primeiros dias e em intervalos de 24 horas até totalizar 10 dias após a semeadura. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão radicular (Brasil, 1992). A porcentagem (G), a velocidade (V) e o tempo médio (t) de germinação foram calculados segundo as fórmulas (equação 2.1, 2.2, 2.3 respectivamente) a seguir, citadas em Labouriau e Valadares (1976):

- Porcentagem de germinação

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

eq. 2.1

onde:

G = porcentagem de germinação

N = número de sementes germinadas

A = número total de sementes colocadas para germinar

- Velocidade de germinação

$$V = 1/t \quad \text{eq. 2.2}$$

onde:

V = velocidade média de germinação (dias⁻¹)

t = tempo médio de germinação

onde:

$$t = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \quad \text{eq. 2.3}$$

onde: n_i = número de sementes germinadas por dia

t_i = tempo de incubação (12 h / 24 h)

Análise estatística dos dados

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

Bioensaio de Crescimento

Nos biensaio de crescimento foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L, cultivar Grand rapids) e de rabanete (*Raphanus sativus* L, cultivar Crimson gigante).

Neste experimento utilizou-se extrato de folha, caule e raiz de *Aristolochia esperanzae* nas concentrações de 100% (100g de material vegetal para 300 mL de água destilada) e a partir desta concentração fez-se diluições com água destilada para 50%, que foram comparadas com o controle (água destilada).

Os experimentos foram realizados em caixas plásticas transparentes (11 x 29 x 9,5 cm) contendo dois tipos de substratos: papel de filtro e fibra de coco (substrato doado pela empresa "Amafibra - Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia - Grupo Socôco", composto de fibras do mesocarpo da casca de coco - *Cocus nucifera*). Cada caixa continha quatro repetições de 10 sementes em cada uma. Os extratos

foram colocados em contato com o substrato 12 horas antes da montagem do experimento para haver melhor absorção.

No substrato papel de filtro foram utilizadas duas folhas umedecidas com 38 mL de extrato e no substrato de fibra de coco foram colocadas 140 g de fibra por caixa, umedecida com 650 mL. As sementes (alface e rabanete) foram previamente germinadas a 24°C, em placas de Petri, forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 4,5 mL de água. Decorridas 45 horas, as sementes germinadas (apresentando entre 2 a 4 mm de radícula) foram transplantadas para as caixas plásticas, contendo os substratos umedecidos com extratos de folha, caule e raiz a 0, 50 e 100%. As caixas foram mantidas em câmara climatizada (Estufa BOD) à 24°C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas no 7º dia após a semeadura, com medições da altura da planta (mm) e comprimento da raiz (mm). Tanto a medida da altura das plantas quanto o comprimento radicular são parâmetros biométricos descritos por Benincasa (1988), onde:

- Altura da planta – considerada a distância do colo da planta até o seu ápice.
- Comprimento radicular – (comprimento da raiz principal) - distância definida do colo da planta até o ápice meristemático do sistema radicular.

As plântulas foram classificadas em normais ou anormais, de acordo com as especificações de Brasil (1992), onde são consideradas anormais aquelas que não mostram potencial para continuar o seu desenvolvimento e não são consideradas anormais plântulas com pequenos defeitos como dano limitado ou pequeno retardamento no crescimento no sistema radicular. Assim, neste trabalho, foram consideradas anormais as plântulas com o sistemas radicular ou aéreo apodrecidos, ausentes, totalmente atrofiados, ou em alguns casos, quando houve mortalidade das plântulas.

Depois de realizadas as medidas biométricas, as plântulas consideradas normais foram separadas das anormais e colocadas em sacos de papel, mantidos em estufa à 80°C durante 48 horas até a estabilização do peso. Decorrido este período o material vegetal foi mantido em dessecador para serem pesados em balança analítica de precisão (com quatro casas decimais), obtendo-se assim os valores de massa seca total das plântulas (mg).

Análise estatística dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas duas a duas, com o uso do teste de Duncan a 5% de probabilidade, com a utilização do *software* 'Statistic 6'.

Análise Química

Preparação do extrato

O extrato de folha de *Aristolochia esperanzae* utilizado na análise química foi preparado obedecendo à proporção de 100 g de material vegetal batido com 300 mL de água destilada. Esta mesma proporção foi utilizada nos experimentos de germinação e crescimento, sendo considerada a concentração de 100%.

O extrato foi feito utilizando-se folhas de *A. esperanzae*, que foram mantidas congeladas até a realização do mesmo. As folhas foram pesadas, picadas e batidas durante cinco minutos, em seguida este extrato foi deixado descansar durante 30 minutos. Depois o extrato foi filtrado em filtro de pano e de papel, com metodologia descrita anteriormente.

A análise química foi realizada apenas com as folhas de *A. esperanzae* devido aos resultados obtidos nos bioensaios de germinação, onde houve inibição da germinação das sementes de alface e rabanete utilizando este extrato em sua maior concentração.

Partição Líquido-Líquido

Depois do processo de filtragem do extrato foi realizado o primeiro fracionamento. Em um funil de separação ($h = 35$ cm e $\phi = 12$ cm) contendo 100 mL do extrato aquoso de folhas de *A. esperanzae* foram passados três solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e η -butanol. Neste funil foram passados 20 mL de cada solvente e esse processo foi repetido por três vezes, totalizando a utilização de 60 mL de cada solvente. Após a colocação de cada solvente com o extrato, agitou-se levemente o funil para uma melhor extração. Em

seguida, a mistura foi deixada decantar até a separação de duas fases: do solvente e do extrato aquoso.

Após as três passagens, as fases obtidas de cada solvente (hexano, acetato de etila ou η -butanol) foram reunidas. Assim, as frações obtidas da partição líquido-líquido foram as de hexano, acetato de etila e η -butanol. Estas frações apresentam polaridade similares às dos solventes utilizados para obter cada uma delas.

Além das três frações citadas anteriormente, obteve-se também a fase contendo o restante do extrato de *A. esperanzae* (chamada de fração aquosa). As quatro frações foram secas, e para os extratos de hexano, acetato de etila e η -butanol foi utilizada a seguinte metodologia: a eles foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirar a água que possivelmente estivesse contida. Em seguida, estes extratos foram colocados em balões e acoplados a um evaporador (Büchi - Modelo rotavapor R) em temperatura de 35 a 40°C para os solventes hexano e acetato de etila, e 40 a 45 °C para o η -butanol, realizando-se assim a total secagem dos extratos, que depois foram transferidos para vidros.

O extrato aquoso foi seco com auxílio do aparelho "Speed-vac" na temperatura de 102°C, onde foi mantido durante 40 horas para secagem total, depois transferido para um vidro.

Depois de secas, foram utilizados 20 mg de cada uma das quatro frações diluídos em 5 mL do solvente correspondente. Em seguida, estas soluções foram colocadas em placas de Petri contendo duas folhas de papel de filtro. Estas placas foram deixadas secar durante 12 horas e depois foi montado o teste de germinação com 30 sementes de alface. O experimento foi mantido em temperatura constante de 24 °C. Concomitantemente, foram montadas placas controle, contendo água (controle 1) e uma mistura dos solventes (controle 2) obedecendo à mesma metodologia.

Através deste experimento pode-se determinar qual fração apresentava os possíveis compostos aleloquímicos responsáveis pela inibição da germinação. Além de determinar qual a faixa de polaridade da substância aleloquímica.

O extrato com atividade alelopática foi submetido a um fracionamento cromatográfico a vácuo, utilizando em sílica comum como fase estacionária. Utilizou-se uma série de eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano + diclorometano (1:1), diclorometano, diclorometano + acetato de etila de etila (9:1), diclorometano + acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila + metanol

(9:1), acetato de etila + metanol (1:1), metanol, metanol + água destilada (9:1), metanol + água destilada (8:2). O esquema simplifica e resume a metodologia utilizada (Figura 7).

Este procedimento rendeu um total de nove frações (nomeadas de A a I) que foram secas e submetidas ao teste de germinação com sementes de alface, utilizando mesma metodologia descrita para os bioensaios de germinação. Dentre as nove frações testadas apenas uma apresentou atividade biológica significativa, ou seja, inibiu a germinação das sementes.

A fim de estabelecer a quantidade mínima necessária desta fração para inibir a germinação. Neste ensaio utilizou-se 5, 10 e 15 mg da fração para o teste de germinação com sementes de alface.

A fração com atividade foi então submetida a um novo fracionamento cromatográfico por exclusão, utilizando-se como fase estacionária o polímero "Sephadex" e como eluente o metanol (coluna de $h = 58$ cm e $\phi = 3$ cm). Deste fracionamento, obtiveram-se 72 frações (respectivamente numeradas), que foram monitoradas por cromatografia de camada delgada analítica e a partir de suas similaridades foram reunidas obtendo-se assim nove sub-frações (Figura 7).

As sub-frações obtidas foram submetidas ao teste de germinação com sementes de alface. Devido à baixa disponibilidade de material vegetal, foram utilizados pequenos beckeres como suporte para a realização do ensaio e papéis de filtro de 2.2 cm de diâmetro onde foram dispostas quatro sementes e as sub-frações. A preparação do extrato consistiu na diluição de 1 mg de cada sub-fração em 0.25 mL de solventes como o diclometano e metanol. Assim a concentração obtida de cada sub-fração foi de 4mg/mL. Mesmo sendo utilizada uma pequena massa de cada sub-fração não foi possível a realização deste bioensaio com todas as frações.

Dentre as frações testadas, uma apresentou atividade biológica significativa, ou seja, inibiu a germinação das sementes de alface. Esta fração foi submetida à ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) para a indicar a classe dos compostos responsáveis por esta inibição (Figura 7).

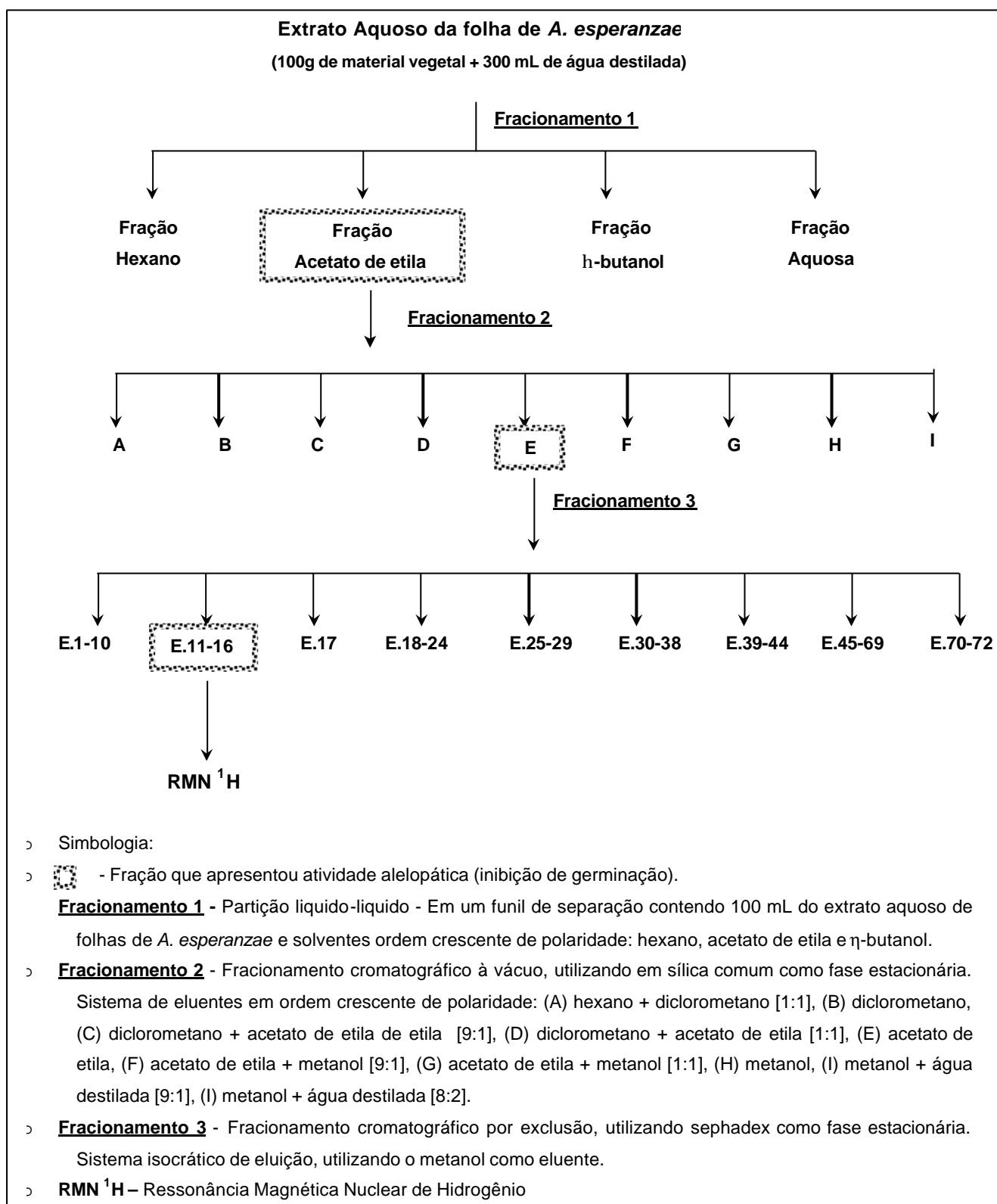


Figura 7 - Esquema sintetizando os fracionamentos utilizados no extrato aquoso de folhas de *A. esperanzae*.

Cromatografia de Camada Delgada Analítica

A cromatografia de camada delgada analítica serviu para monitorar os fracionamentos e para dar suporte à reunião das frações. Ela foi útil também para verificar a similaridade das substâncias com os solventes. O desenvolvimento cromatográfico procedeu-se, sempre que realizado, de forma ascendente e unidimensional, com placas ou papéis simples de sílica ($\approx 3.2 \times 4.0$ cm) e com solventes orgânicos.

Cada cromatoplaça (placa de sílica com as substâncias separadas) foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada através da exposição a vapores de vanilina.

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

O pH de cada extrato utilizado nos bioensaios foi medido com o auxílio do pHmetro. Esta medição foi realizada com os extratos dos diferentes órgãos de *A. esperanzae* em sua maior concentração, isto é, 100% (100g de material vegetal + 300 mL de água destilada).

b) Potencial osmótico

A medição de concentração molar foi realizada com um osmômetro (μ Osmotte, modelo 5004 automatic osmometer) onde foram utilizados 50 μ l de cada extrato mantido a temperatura de 24°C, essa medida foi expressa em mOsm/Kg. Os extratos submetidos à medição do potencial osmótico foram os extratos mais concentrados (100% de concentração) de folha, caule e raiz de *A. esperanzae*.

Os valores de potencial osmóticos foram convertidos da unidade de mOsm/Kg para MPa, utilizando a equação 2.4 citada por Larcher (2000):

$$1 \text{ Osmol/Kg} = 0,00832 \times T_{\text{abs}} \text{ MPa} \quad \text{eq. 2.4}$$

Onde:

T_{abs} - Temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

c) Experimento com PEG

Para a determinação dos efeitos do potencial osmótico, realizou-se um experimento utilizando soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) com diferentes valores de potencial osmótico: 0, -0.2, -0.3 e -0.4 MPa, segundo especificações de Villela (1991). Neste experimento foram colocadas para germinar 30 sementes de alface e rabanete para cada repetição, mantidas a 24°C.

Resultados e Discussão

Rendimento

Quanto aos valores de rendimento de material vegetal para os extratos de *A. esperanzae*, pode-se observar que o extrato de folha foi aquele que obteve maior rendimento, ou seja, 28.5 mg/mL, seguido dos de fruto e flor. Os extratos de raiz e caule obtiveram valores um pouco inferiores.

Aquila (2000) calculando o rendimento dos extratos de *Ilex paraguariensis* obteve rendimento superior aos encontrados por *A. esperanzae*, variando entre 98 e 192 mg/mL.

Percebe-se assim que, o aleloquímico e sua atividade, são fatores mais relevantes que a quantidade de material vegetal, pois 30 mg/mL contidos em 5mL de extratos de *A. esperanzae* foram necessários para inibir 100% da germinação de 30 sementes de *Lactuca sativa* (alface), enquanto que para extratos de folhas da base, do ápice e jovens de *I. paraguariensis* obtiveram rendimentos de 150, 153 e 143 mg/mL, no entanto, inibiram 38, 48, e 11% respectivamente a germinação de 20 sementes de alface.

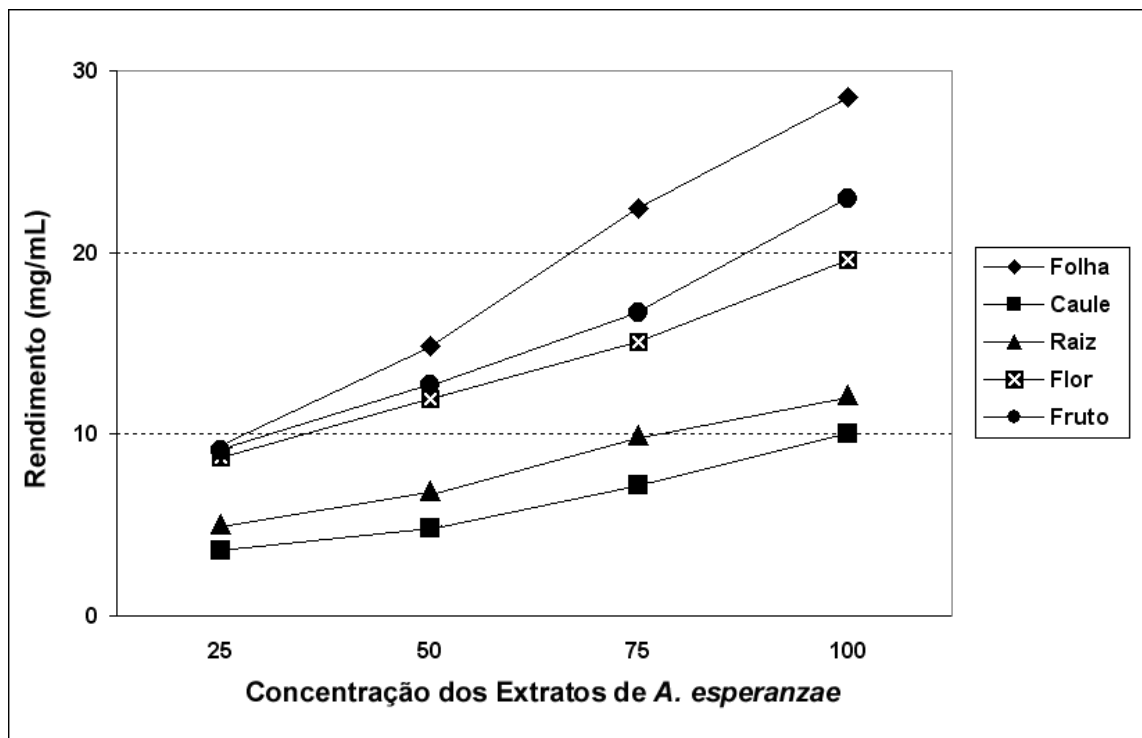


Figura 8 - Valores médios de quantidade de material vegetal obtido de 5 mL dos extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto de *Aristolochia esperanzae*. Média de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

Quando foram comparadas as causas de variação, ou seja, órgãos (folha, caule, raiz, fruto e flor) e concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) foi registrada interação significativa para os dois parâmetros analisados: porcentagem e velocidade de germinação. Este comportamento foi registrado tanto para sementes de alface (Tabela 1) quanto para as sementes de rabanete (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para os parâmetros de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação dos diferentes extratos (órgãos) de *Aristolochia esperanzae* e diferentes concentrações.

Causas da variação	Porcentagem de germinação			Velocidade de germinação	
	G.L.	Quadrados Médios	Valores de F	Quadrados Médios	Valores de F
Órgãos (O)	4	2926,0	59,35 ***	0,01568	65,18 ***
Concentração (C)	4	3416,0	69,30 ***	0,1650	692,8 ***
Interação O x C	16	873,6	17,72 ***	0,003263	13,69 ***
Resíduo	75	49,29		0,0002382	
C.V.		9,5884		7,801	

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Tabela 2 – Resultado da análise de variância para os parâmetros de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação dos diferentes extratos (órgãos) de *Aristolochia esperanzae* e diferentes concentrações.

Causas da variação	Porcentagem de germinação			Velocidade de germinação	
	G.L.	Quadrados Médios	Valores de F	Quadrados Médios	Valores de F
Órgãos (O)	4	476,0	11,52 ***	0,02172	17,39 ***
Concentração (C)	4	902,0	21,83 ***	0,1219	97,60 ***
Interação O x C	16	121,2	2,932 ***	0,002565	2,054 *
Resíduo	75	41,32		0,001249	
C.V.		8,7573		15,7208	

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Os resultados referentes à influência alelopática de *A. esperanzae* na germinação de alface e rabanete estão resumidos nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

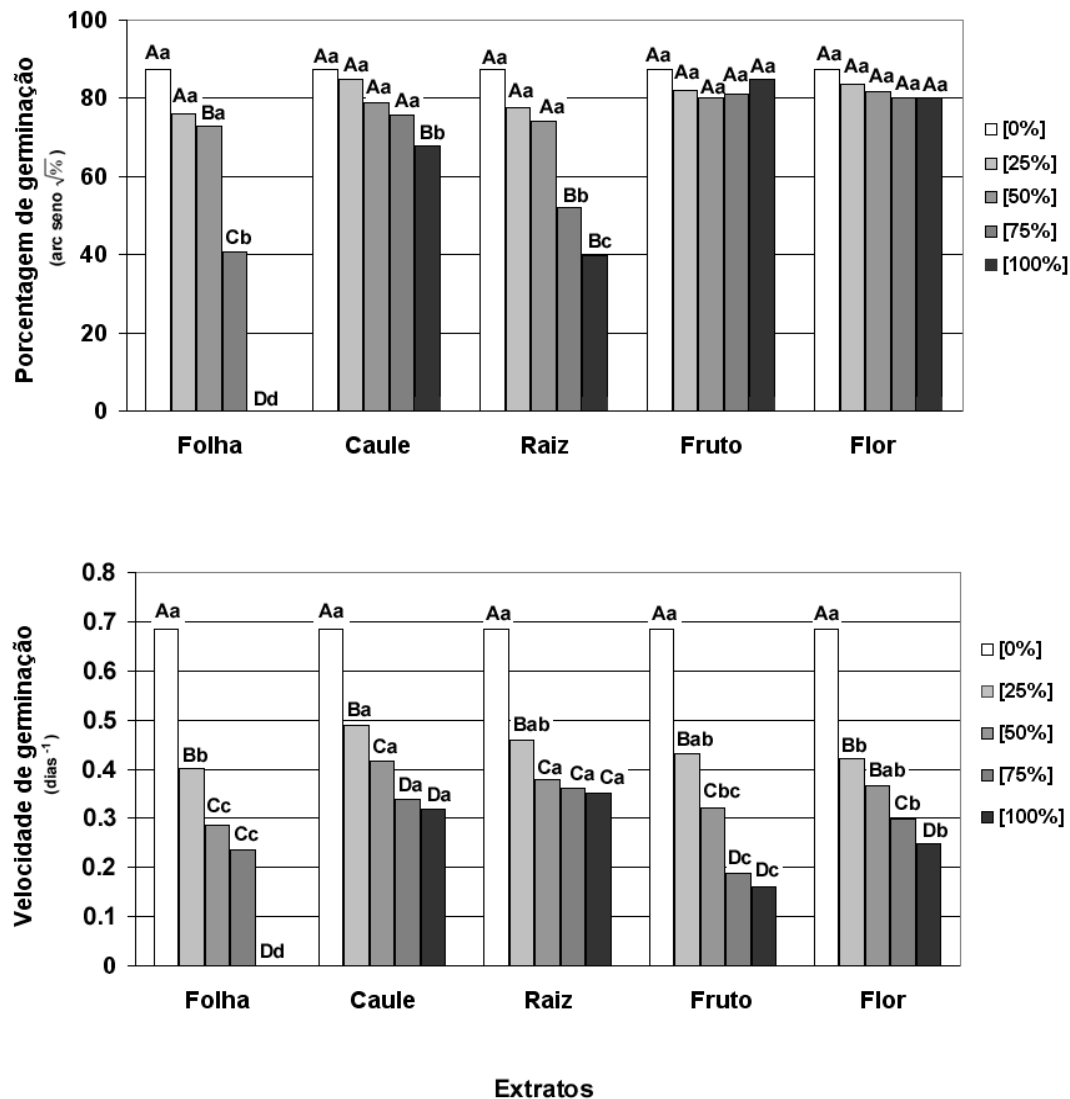


Figura 9 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação de diferentes extratos de *Aristolochia esperanzae* em quatro concentrações, mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 9 pode se observar que os extratos de fruto e de flor não influenciaram significativamente o processo germinativo das sementes de alface, em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, os extratos de folha, caule e raiz reduziram a porcentagem de germinação. Os valores de porcentagem de germinação são diferentes estatisticamente do controle, a partir da concentração de 100% para o extrato de caule e 75% para o de raiz. O extrato de folha foi o que provocou a maior inibição na germinação de sementes de alface, onde a partir da concentração de 50% foi observada uma redução significativa dos valores, em relação ao controle. Esta diferença torna-se mais acentuada na concentração de 75%, e a inibição completa da germinação ocorreu com o extrato 100% concentrado.

Estes resultados se assemelham aos de Saxena *et al.* (1996), que observou que o aumento da concentração dos extratos de *Pennisetum glaucum* diminuiu as taxas de germinação de sementes da própria espécie.

Quanto à velocidade de germinação das sementes de alface, pode-se notar que todos os extratos causaram um atraso no processo germinativo a partir da concentração de 25%. Observou-se então, que mesmo os extratos de fruto e flor, que não alteraram a porcentagem de germinação das sementes, atrasaram a germinação das mesmas. Percebeu-se que há uma tendência de decréscimo nos valores de velocidade de germinação quando se aumenta a concentração dos extratos, e este fato é bem evidenciado quando se usou extrato concentrado de folha e de fruto, onde foram registrados os menores valores de velocidade (Fig. 9).

Pinã-Rodrigues e Lopes (2001) também observaram que os extratos de *Mimosa caesalpiniaefolia* não afetaram a porcentagem de germinação, porém, os mesmos extratos reduziram a velocidade de germinação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia alba*).

A Figura 10 apresenta os valores de porcentagem e velocidade de germinação das sementes de rabanete quando mantidas em meio contendo os extratos de *A. esperanzae*. O extrato de flor causou inibição da porcentagem de germinação apenas na concentração de 100%, e o extrato de folha proporcionou uma redução da taxa de germinação de sementes de rabanete a partir de 75% de concentração. Os extratos de caule, raiz e fruto não influenciaram significativamente na porcentagem de germinação das sementes de rabanete.

Quanto à velocidade de germinação das sementes de rabanete verificou-se que todos os extratos diminuíram significativamente estes valores, quando comparados com os do grupo controle, e estes decréscimos se acentuam com o aumento da concentração dos extratos. Os menores valores de velocidade foram registrados com a utilização dos extratos mais concentrados de flor, fruto e folha (Figura 10).

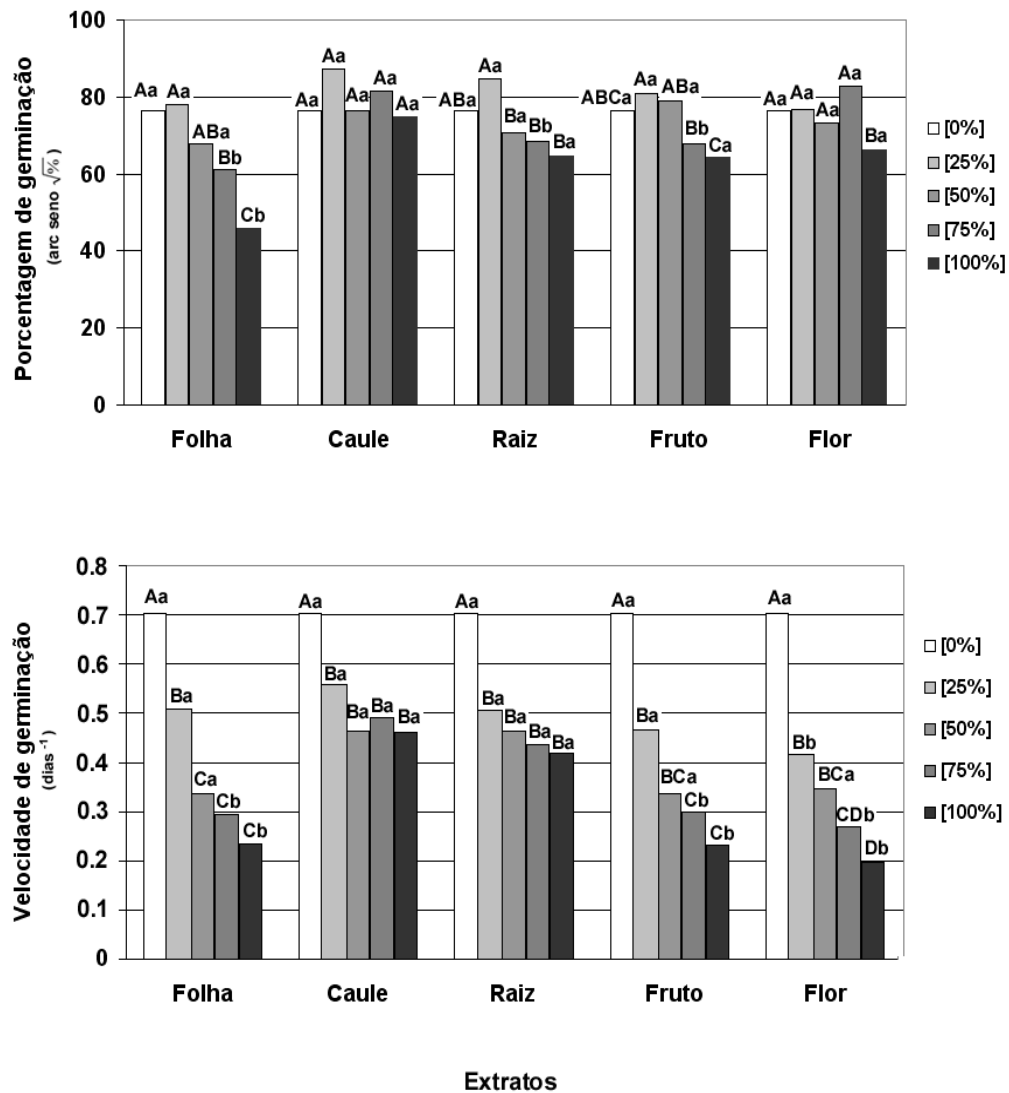


Figura 10 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação de diferentes extratos de *Aristolochia esperanzae* em quatro concentrações, mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diante dos resultados obtidos para a germinação das sementes de alface e rabanete, na presença dos extratos de *A. esperanzae*, observou-se que os extratos de folha foram os que proporcionaram maior redução na porcentagem de germinação. No entanto, todos os outros extratos, provenientes dos diferentes órgãos de *A. esperanzae*, diminuíram a velocidade de germinação das sementes, em todas as concentrações, quando comparadas com o grupo controle (Figs 9 e 10).

Diferenças nas respostas alelopáticas de compostos de diferentes órgãos de uma mesma planta também foram registradas por Juan Jimenez-Osornio *et al.* (1996), Delachiave *et al.* (1999a; 1999b) e Wu *et al.* (2000). Friedmam (1995) afirma que a quantidade de aleloquímicos e sua liberação pelos órgãos da planta são variações que ocorrem de espécie para espécie.

Bioensaio de Crescimento

Quando foram comparadas todas as causas de variação: substrato (fibra de coco e papel de filtro), anormalidade das plântulas (plântulas anormais e normais), diferentes órgãos (folha, caule e raiz) e concentrações (0, 50 e 100%) registrou-se interação significativa para todos os parâmetros estudados (altura das plântulas, comprimento da raiz e massa seca total). Este resultado foi observado tanto para as sementes de alface (Tabela 3) quanto para sementes de rabanete (Tabela 4).

Tabela 3 – Resultado da análise de variância para os parâmetros parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação dos diferentes extratos de *Aristolochia esperanzae*. Foram consideradas como causas de variação os órgãos e as concentrações dos extratos, a anormalidade das plântulas e o substrato onde foram crescidas as plântulas.

Causas da variação	Parte aérea			Comprimento da raiz		Peso seco total	
	G.L.	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F
Substrato (S)	1	6369,24	1121,71 ***	581,17	77,626 ***	1,09377	99,143 ***
Órgão (O)	2	159,25	28,047 ***	260,91	34,850 ***	0,24482	22,192 ***
Concentração (C)	2	911,53	160,533 ***	8411,91	1123,56 ***	4,35543	394,794 ***
Anormalidade (A)	1	5423,71	955,190 ***	4336,99	579,282 ***	4,39252	389,155 ***
Interação: S x O x C x A	4	236,88	41,718 ***	50,31	6,719 *	0,32697	29,638 ***

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Tabela 4: Resultado da análise de variância para os parâmetros parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação dos diferentes extratos de *Aristolochia esperanzae*. Foram consideradas como causas de variação os órgãos e as concentrações dos extratos, a anormalidade das plântulas e o substrato onde foram crescidas as plântulas.

Causas da variação	Parte aérea			Comprimento da raiz		Peso seco total	
	G.L.	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F
Substrato (S)	1	20363,5	506,555 ***	8017,26	295,969 ***	44,079	40,441 ***
Órgão (O)	2	76,5	1,903 n/s	826,47	30,510 ***	10,137	9,300 *
Concentração (C)	2	2431,4	60,481 ***	22174,29	818,596 ***	127,375	116,864 ***
Anormalidade (A)	1	24234,4	602,846 ***	9919,33	366,187 ***	188,811	173,230 ***
Interação S x O x C x A	4	769,0	19,128 ***	326,76	12,063 ***	15,842	14,535 ***

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Anormalidade

Com relação à influência alelopática no crescimento de plântulas de alface e rabanete foi registrada anormalidade no sistema caulinar onde as plantas apresentaram-se menores e retorcidas, porém esta anormalidade foi bem mais evidente no sistema radicular, onde as raízes primárias se apresentaram atrofiadas, defeituosas (Figuras 12d, 13c e 13d), e em alguns casos, praticamente ausentes (Figuras 12c e 12e). Algumas plântulas também apresentaram raízes curtas e desproporcionais em relação a outras estruturas da planta (Figuras 12g e 13f).

A Figura 11 contém a porcentagem de plântulas consideradas anormais, crescidas em papel de filtro e em fibra de coco. Pode-se observar que os extratos de caule e raiz nas concentrações de 50 e 100%, quando adicionados ao papel de filtro, provocaram anormalidade em quase todas as plântulas de alface que nele cresceram. Nota-se ainda, que neste substrato, o extrato de raiz na concentração de 100%, provocou a morte de todas as plântulas de alface (estas se apresentavam completamente apodrecidas, impossibilitando a medição) (Figura 12f). A anormalidade das plântulas de alface também foi evidenciada quando se utilizou como substrato a fibra de coco, porém, apenas no extrato de raiz a 100% de concentração (Figuras 11 e 12g).

Quanto ao percentual de anormalidade encontrado em rabanete (Figura 11) observa-se que plântulas crescidas em substrato papel de filtro umedecido com os extratos de caule e raiz, ambos a 100% de concentração, causaram anormalidade em todas as plântulas. Além disto, provocaram a mortalidade de 22,5% e 32,5% das plântulas, respectivamente. O uso de extrato de raiz, na concentração de 50%, causou anormalidade em mais de 80% das plântulas.

Para as plântulas de rabanete crescidas na fibra de coco, a porcentagem de anormalidade foi menor do que no papel de filtro, onde os extratos de caule na concentração de 50% e 100% causaram anormalidade em apenas 5 e 17,5 % das plântulas, respectivamente (Figura 11). O extrato de raiz na concentração de 100% causou anormalidades em e 57,5 % das plântulas (Figuras 11 e 13f).

Anormalidades em plântulas de alface também foram observadas por Medeiros e Luchesi (1993) com o uso de extratos aquosos de ervilhaca (*Vicia sativa*) e por Aquila (2000) com extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). A presença de anormalidade em raízes parece ser um bom parâmetro para registro de

anormalidade de plântulas, pois este órgão é mais sensível à ação alelopática que a parte aérea das plântulas (Pires e Oliveira, 2001). A avaliação da anormalidade das plântulas é um instrumento valioso nos experimentos de alelopatia e a necrose da radícula é o sintoma mais comum da anormalidade (Ferreira e Aquila, 2000).

Ao analisar o crescimento das plântulas crescidas em papel de filtro e na fibra de coco, umedecidos em água (controle), verificou-se que as plântulas apresentaram desenvolvimento diferenciado. Observou-se que as plântulas de alface e rabanete crescidas em fibra de coco eram mais altas que aquelas crescidas em papel de filtro (Fig. 3, 4 e Fig. 6, 9). No entanto, estes valores se invertem quando se analisa o comprimento radicular, onde as plântulas crescidas em fibra de coco apresentaram valores significativamente menores do que as que cresceram em papel de filtro (Fig. 3, 4 e Fig. 7, 10). Este fato pode ser explicado pela necessidade de sustentação das plantas no substrato de papel de filtro e pela característica física dos substratos, onde no papel de filtro as raízes estão livres e na fibra de coco estas têm que exercer uma pressão de crescimento para penetrarem no substrato.

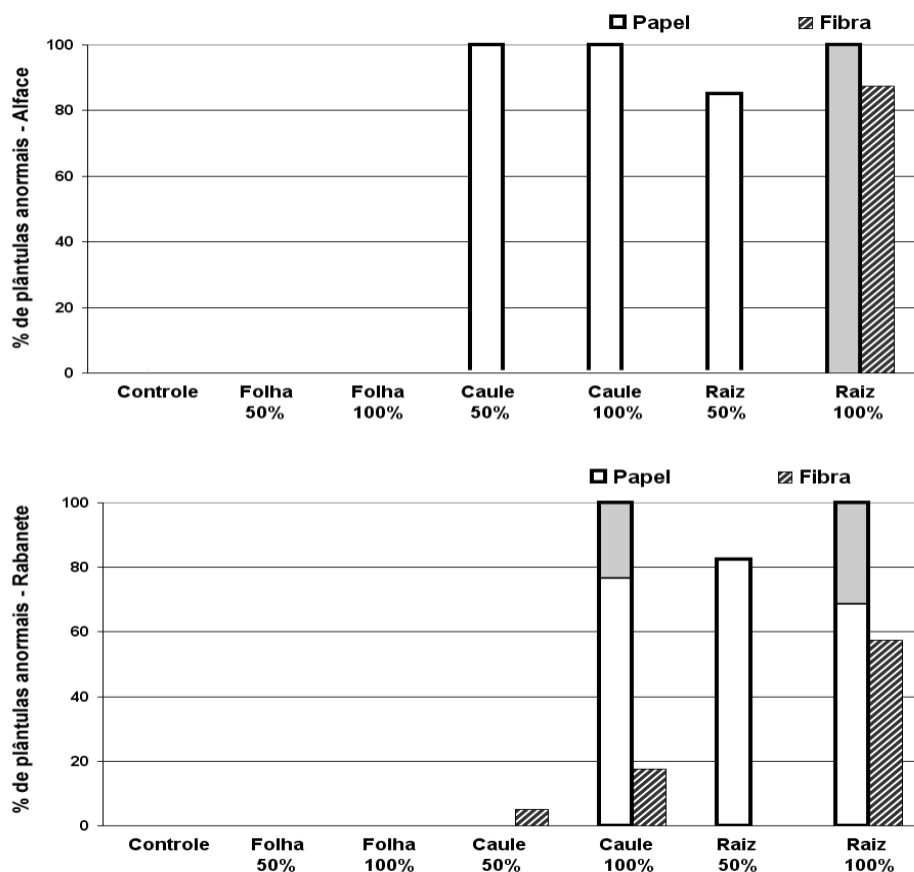


Figura 11 - Porcentagem de plântulas anormais de alface (*Lactuca sativa*) e rabanete (*Raphanus sativus*) quando crescidas em papel de filtro e fibra de coco umedecidos com extratos de folha, raiz e caule de *Aristolochia esperanzae* em duas concentrações (50 e 100%). Porcentagem média de quatro repetições de 10 plântulas por tratamento. A área cinza na barra dos extratos de raiz na concentração de 100% para alface, e caule e raiz na concentração de 100% para rabanete (em papel de filtro), correspondem à mortalidade de 100, 22.5 e 32.5% das plântulas, respectivamente.

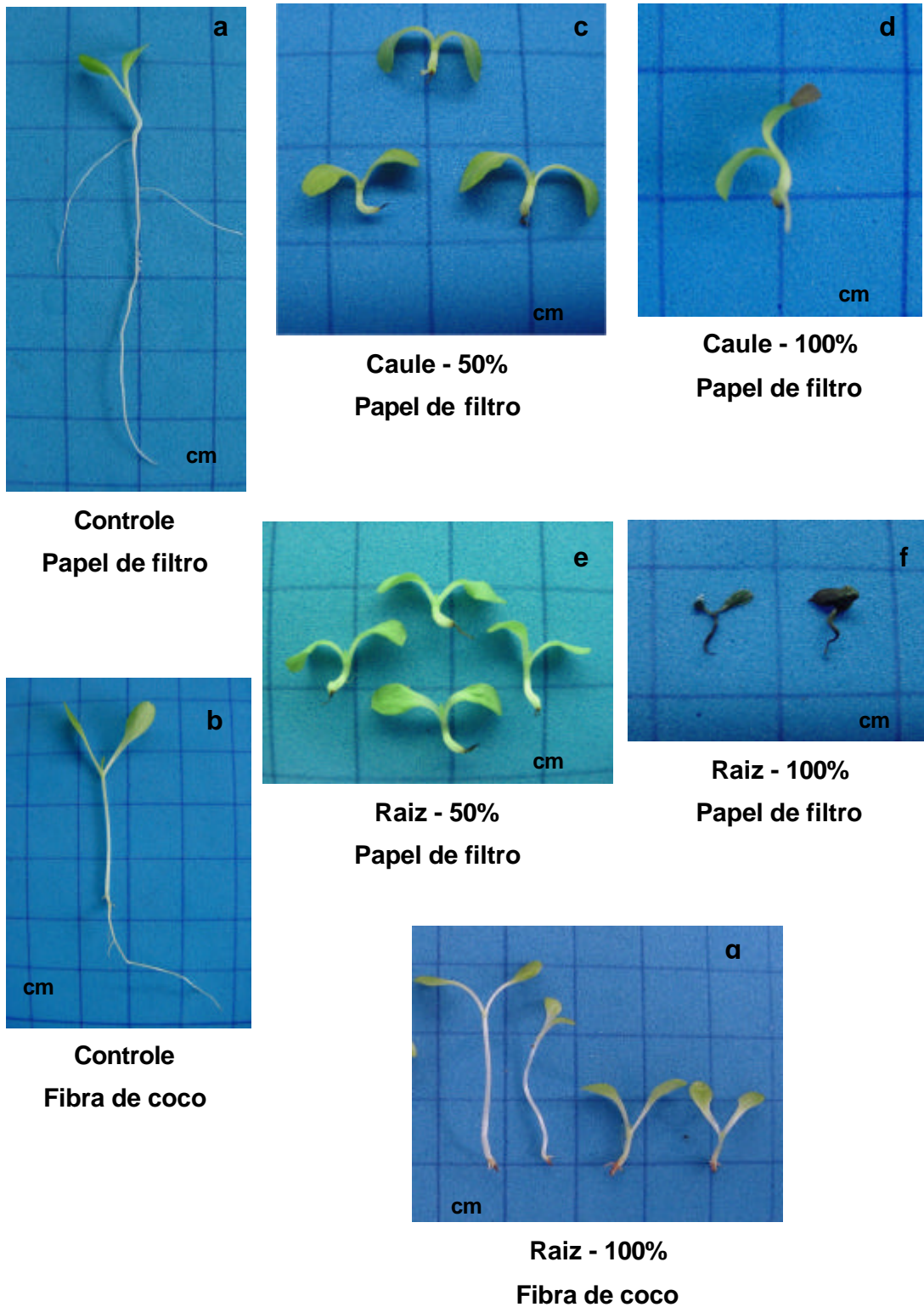
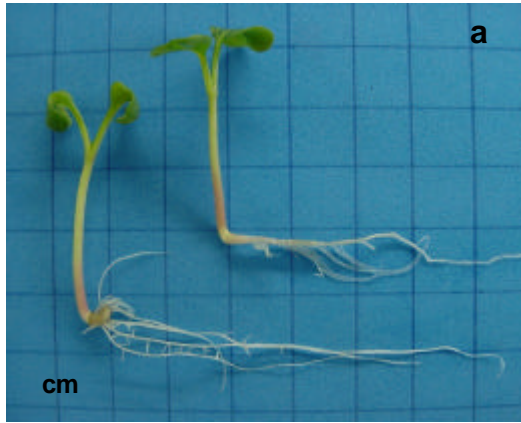
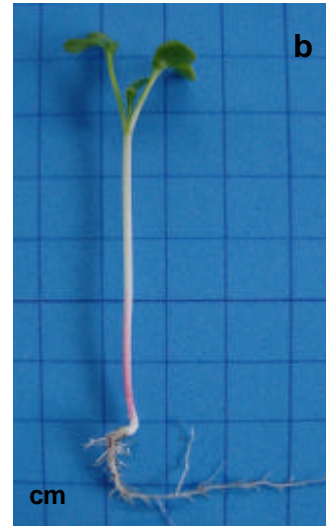


Figura 12 - Anormalidade de plântulas de alface (*Lactuca sativa*) quando crescidas em papel de filtro ou fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (caule e raiz) e concentrações (50 e 100%) de *Aristolochia esperanzae*. O extrato de folha não provocou anormalidade nas plântulas. (Foto: Ortolan, R.L.).



Controle^e
Papel de filtro



Controle
Fibra de coco



Caule - 100%
Papel de filtro



Raiz - 50%
Papel de filtro



Raiz - 100%
Papel de filtro



Raiz - 100%
Fibra de coco

Figura 13 - Anormalidade de plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) quando crescidas em papel de filtro ou fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (caule e raiz) e concentrações (50 e 100%) de *Aristolochia esperanzae*. O extrato de folha não provocou anormalidade nas plântulas. (Foto: Ortolan, R.L.).

A partir dos resultados da Figura 14 pode-se verificar que os valores de altura das plântulas de alface, em geral, foram maiores quando crescidas na fibra de coco, se comparados com aquelas crescidas em papel de filtro. Na fibra de coco, os valores de altura das plântulas foram estatisticamente maiores quando foram utilizados extratos de folha nas concentrações de 50 e 100% e de caule e raiz na concentração de 50%, quando comparados ao grupo controle, evidenciando assim, um estímulo no crescimento destas plântulas.

Quando se utilizou papel de filtro umedecido com extrato de folha na concentração de 50%, também foi observado aumento na altura das plântulas, se comparado ao grupo controle. Oposto a este resultado, todos os outros extratos e concentrações apresentaram valores que não diferiram estatisticamente do controle, com exceção do extrato de caule na concentração de 100% para as plântulas anormais, o qual provocou uma inibição significativa (Figura 14).

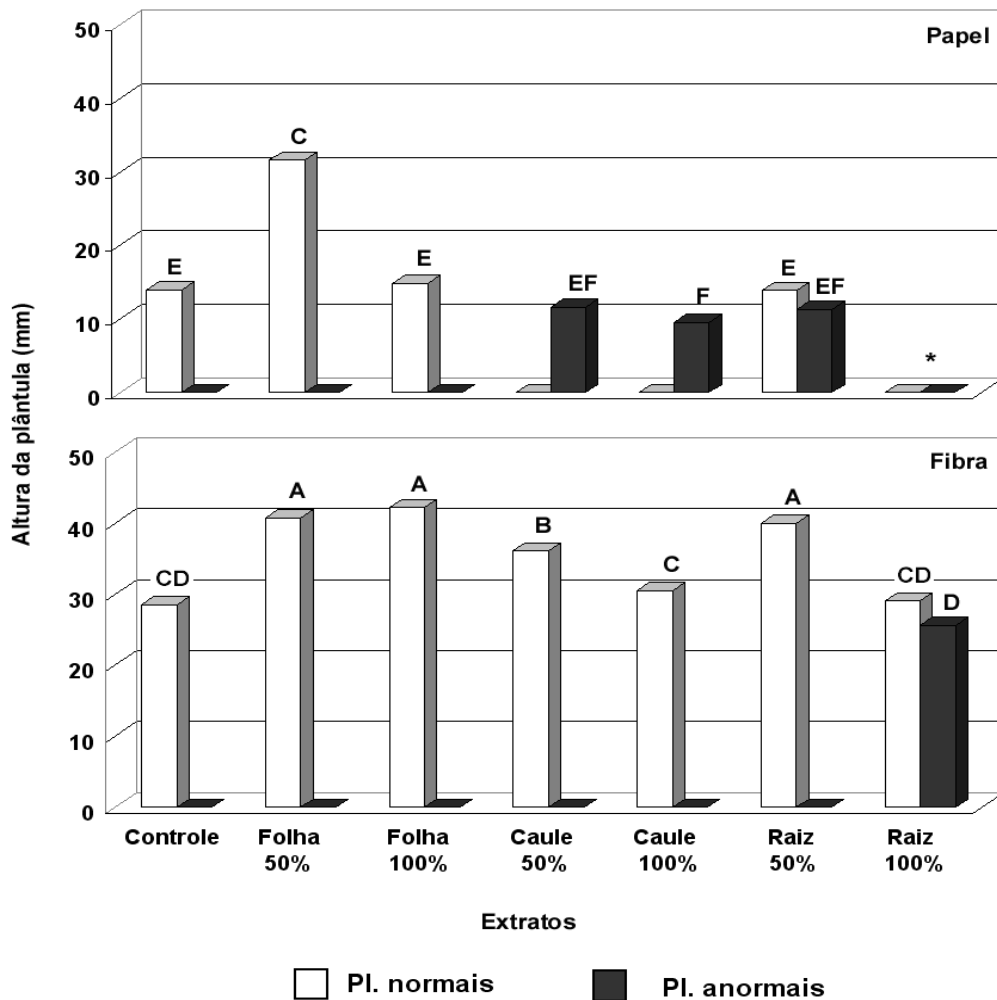


Figura 14 - Valores médios da altura de plântulas normais e anormais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos. (* = todas plântulas mortas).

Com relação ao comprimento da raiz das plântulas de alface, crescidas na fibra de coco umedecidas com os extratos de folha, caule e raiz, na concentração de 50%, estes apresentaram valores estatisticamente maiores que os do controle, evidenciando que estes extratos, nesta concentração, estimularam o crescimento do sistema radicular. No entanto, estes mesmos extratos em concentração mais elevada (100%), passaram a inibir o crescimento das raízes (Figura 15).

As plântulas crescidas no papel de filtro apresentaram valores de comprimento radicular, em todos os extratos e concentrações, estatisticamente menores com relação ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Chou *et al.* (1998) em plântulas de alface com extratos de *Acacia confusa*.

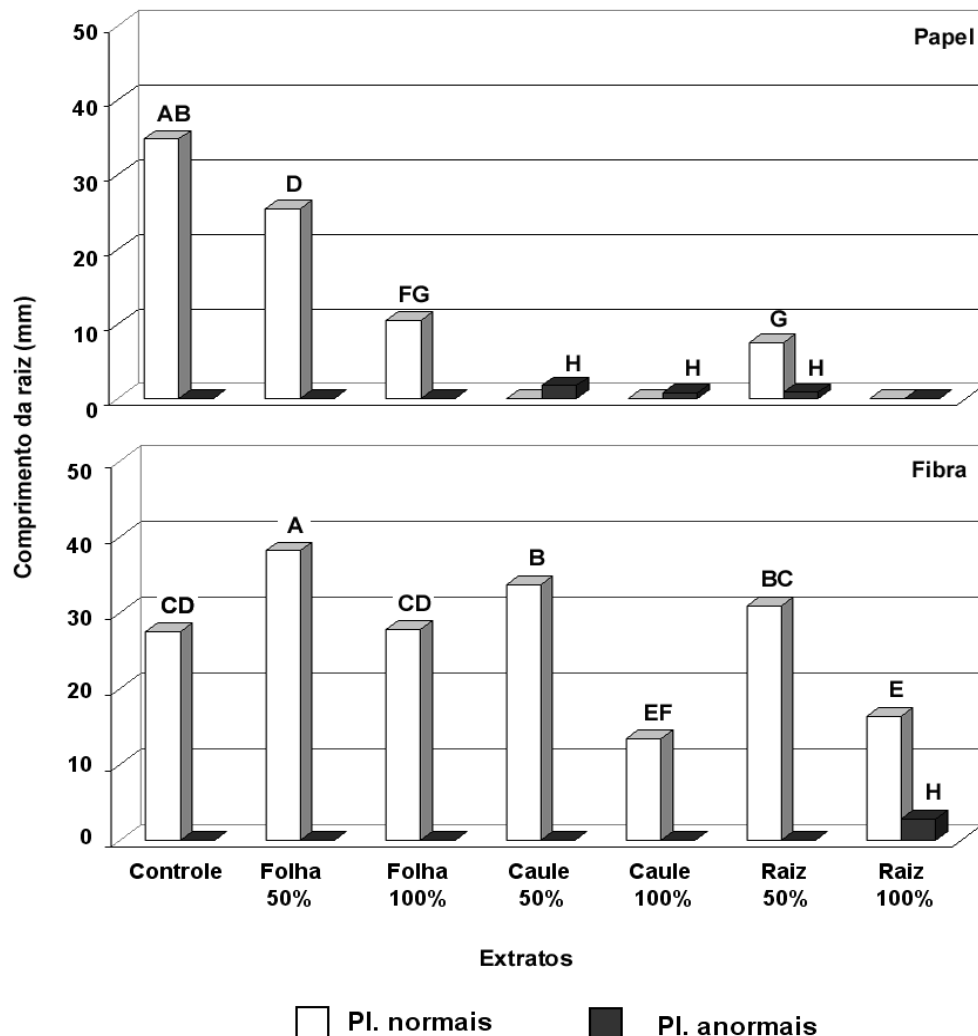


Figura 15 - Valores médios comprimento radicular de plântulas normais e anormais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos. (* = todas plântulas mortas).

Quanto à massa seca total observa-se que apenas alguns valores, principalmente os de plântulas normais, não diferiram significativamente em relação ao grupo controle, tanto nas plântulas crescidas na fibra de coco quanto nas crescidas no papel de filtro (Figura 16).

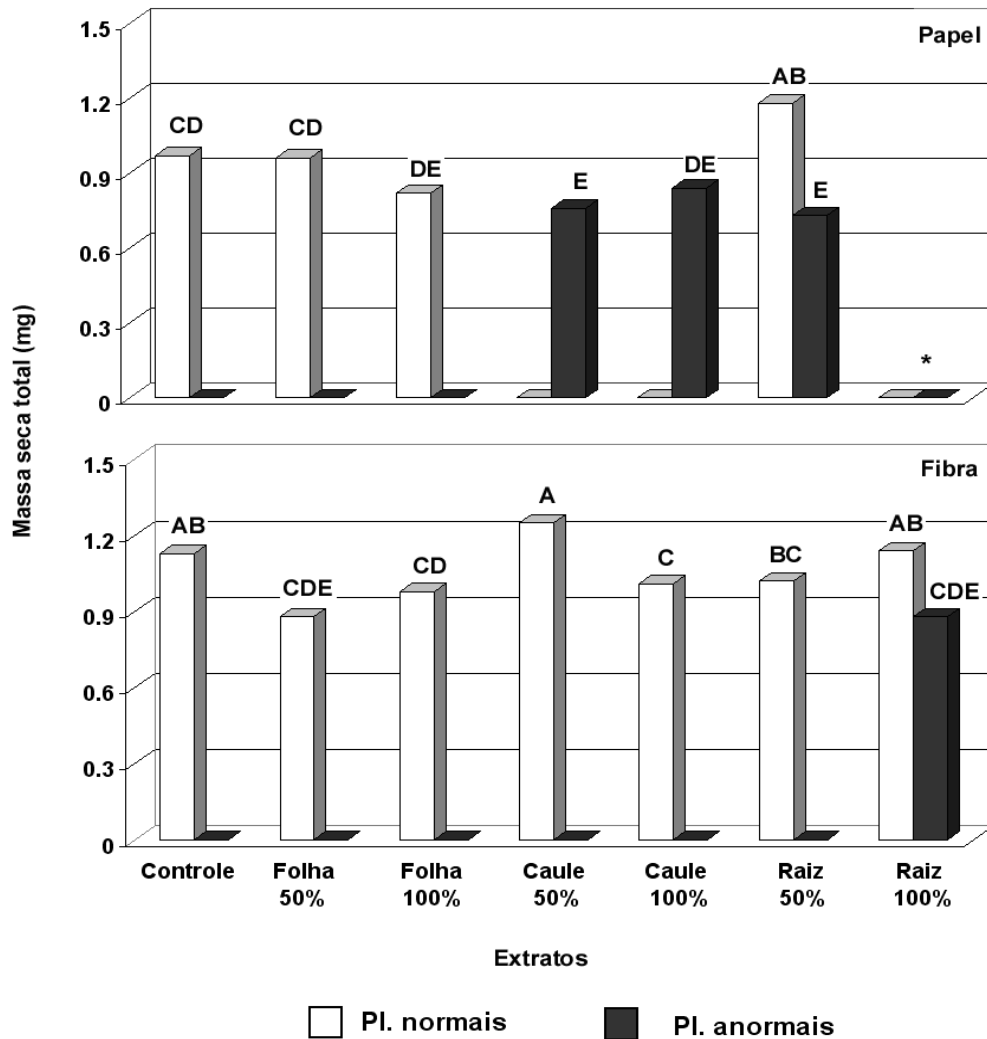


Figura 16 - Valores médios de massa seca total de plântulas normais e anormais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidas com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos. (* = todas plântulas mortas).

A Figura 17 evidencia que as plântulas de rabanete crescidas na fibra de coco apresentaram valores mais elevados de altura, em quase todos os extratos, quando comparadas com aquelas crescidas no substrato de papel de filtro.

Quando se utilizou a fibra de coco houve um maior crescimento da altura das plântulas normais de rabanete crescidas sob a influência dos extratos de caule e raiz

nas concentrações de 50 e 100% (Figura 17). Porém, no caso em que estes extratos causaram anormalidade (caule 50 e 100% e raiz 100%) seus valores foram significativamente menores que o controle (Figuras 13 e 17).

As plântulas de rabanete crescidas no papel de filtro umedecidos com extratos de folha a 50 e 100% de concentração e caule (50%) apresentaram um incremento no crescimento, quando comparadas com o grupo controle. No entanto, os extratos de caule a 100% e raiz nas concentrações de 50 e 100% inibiram o crescimento das plântulas, tanto nas plântulas consideradas normais quanto para aquelas consideradas anormais (Figura 17).

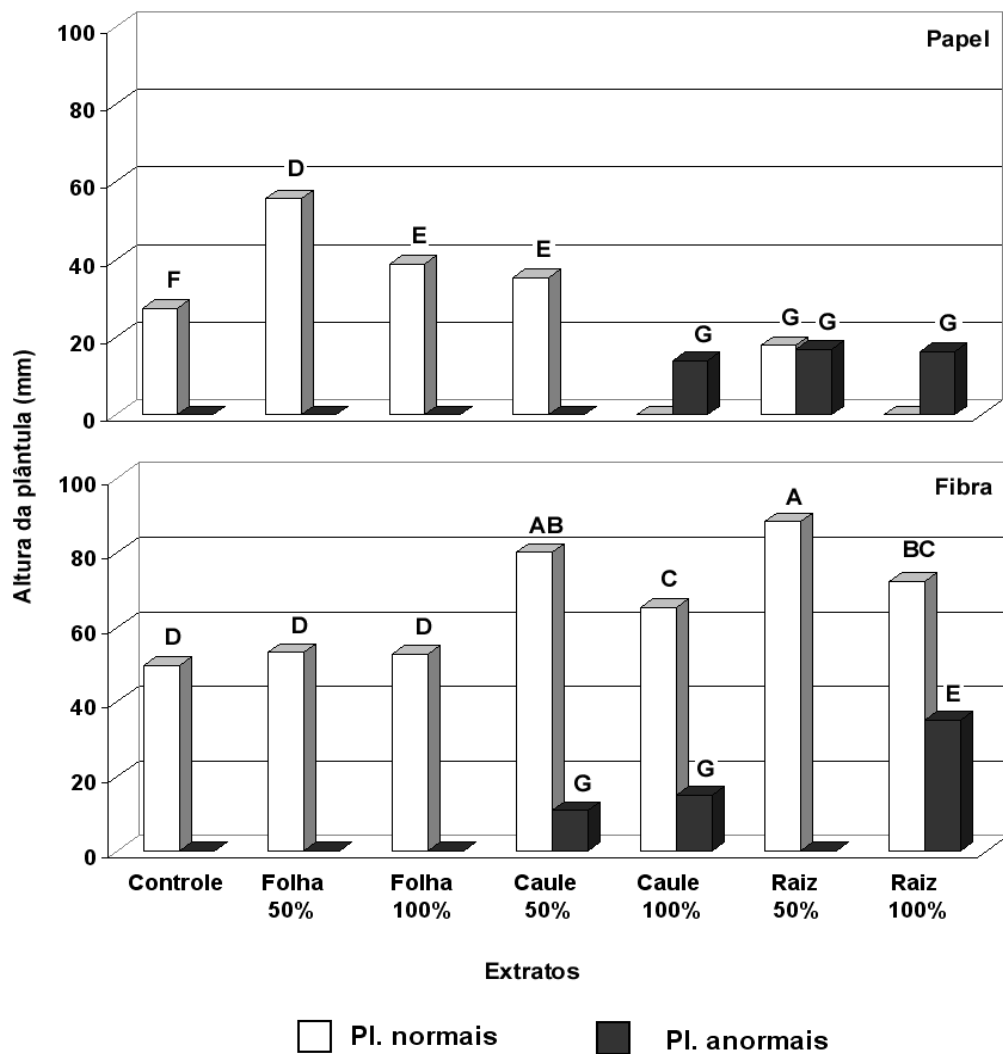


Figura 17 - Valores médios da altura das plântulas normais e anormais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Quando se analisou o comprimento da raiz principal das plântulas de rabanete crescidas na fibra de coco, o uso de todos os extratos na menor concentração (50%) estimulou o crescimento, em comparação com o grupo controle. Somente os extratos de caule nas duas concentrações e de raiz na concentração de 100% inibiram significativamente o crescimento radicular das plântulas de rabanete consideradas anormais (Figura 18). Vaccarini e Bonetto (2000) também verificaram que tanto o aleloquímico, quanto a sua concentração, proporcionaram respostas diferentes em raízes de plântulas de alface. As plântulas de rabanete crescidas em papel de filtro umedecido com todos os extratos apresentaram valores de comprimento radicular menores que os do controle. Nota-se uma grande diferença na resposta proporcionada pelos extratos de folha, se comparada com as de caule e raiz. Também pode-se notar uma diferença entre as plântulas normais e anormais sob influência dos extratos de raiz e caule (Figura 18).

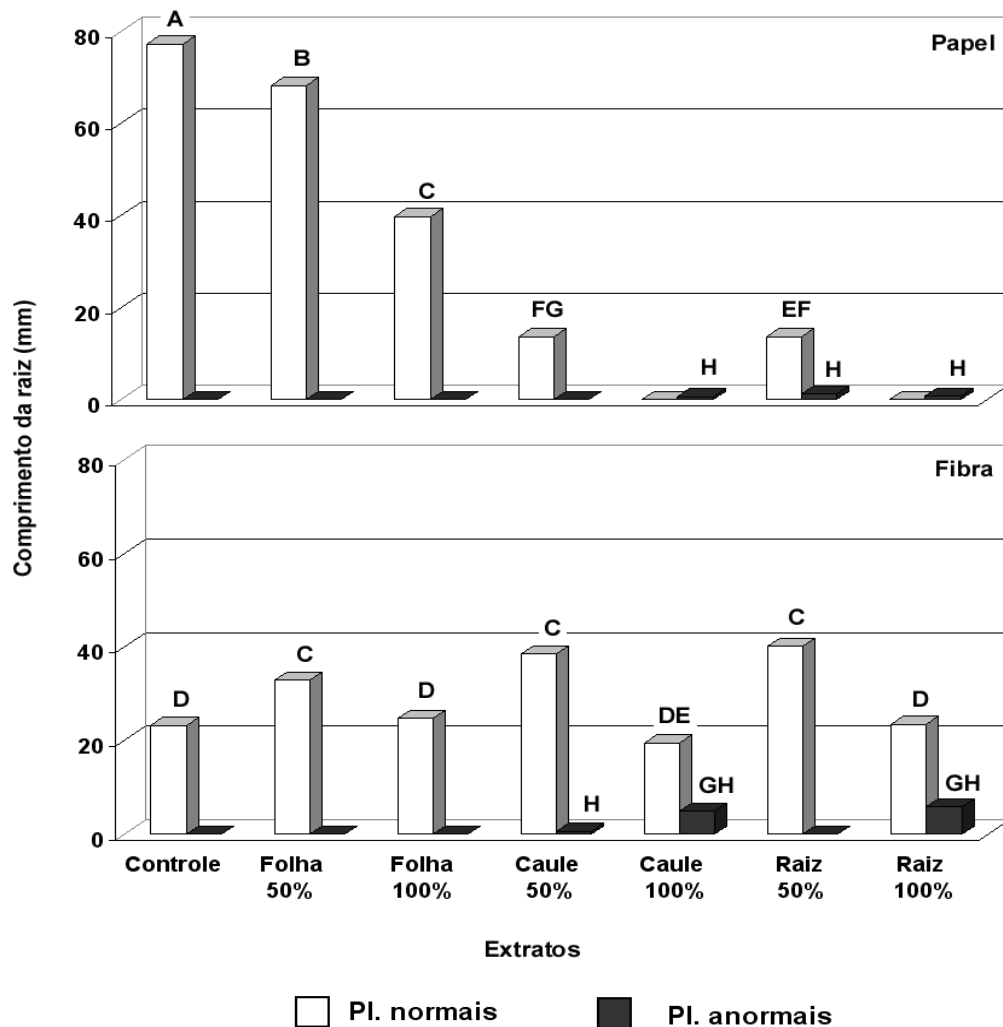


Figura 18 - Valores médios comprimento radicular de plântulas normais e anormais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Quanto à massa seca total, para plântulas de rabanete, não há uma tendência de diminuição ou de aumento dos valores, quando se comparam os diferentes extratos e suas concentrações, com exceção dos valores obtidos para as plântulas anormais, crescidas na fibra de coco, umedecida com os extratos de caule, onde foram registrados os menores valores (Figura 19). No entanto, os extratos e suas concentrações interferiram no crescimento das plântulas. Isso pode ser explicado por um investimento diferenciado de matéria orgânica, ou na raiz ou na parte aérea, dependendo do extrato ou da concentração utilizada.

Segundo Rodrigues *et al.* (1992) os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas.

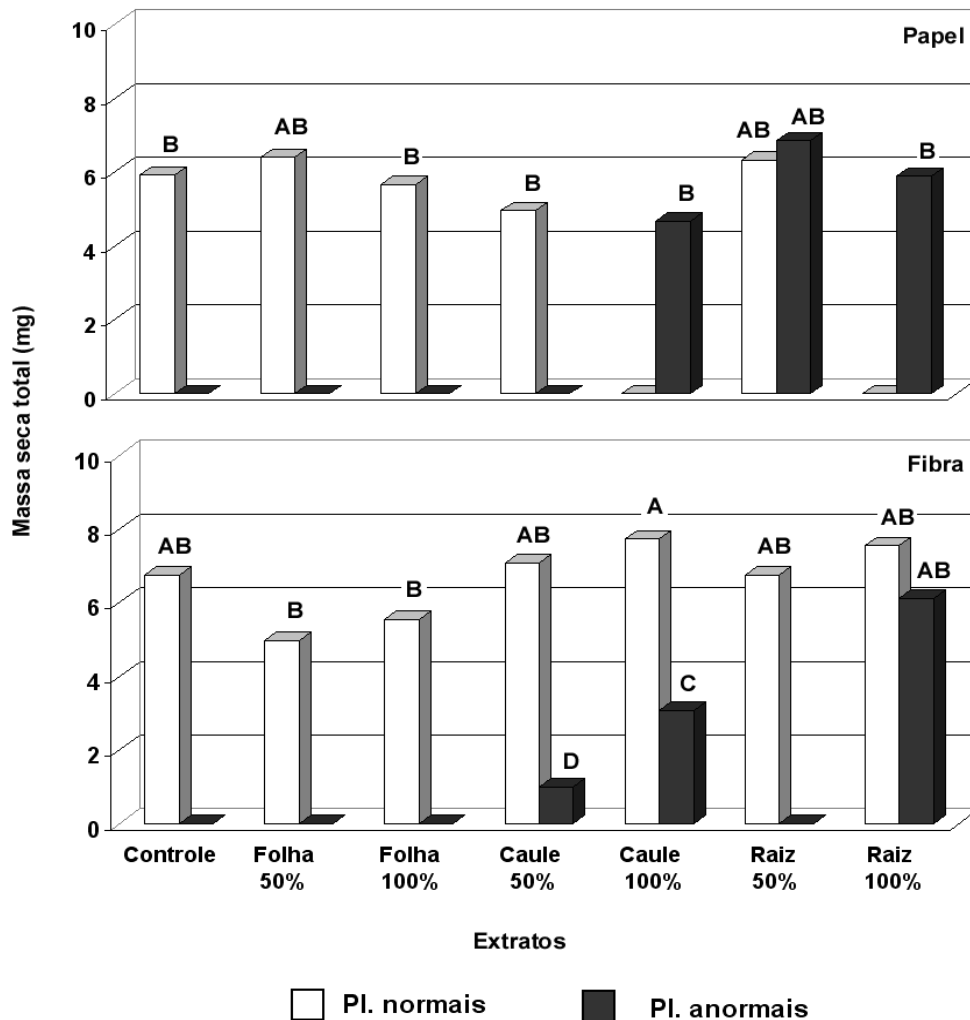


Figura 19 - Valores médios de massa seca total de plântulas normais e anormais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Aristolochia esperanzae*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Nos resultados obtidos no bioensaio de crescimento destacam-se diferenças entre as respostas provenientes dos dois substratos testados. Observa-se que a porcentagem de plântulas anormais foi superior quando se utilizou o papel de filtro. Em geral, os valores da altura das plântulas foram maiores naquelas crescidas na fibra de coco. Além disso, notou-se que a inibição por compostos aleloquímicos foi maior quando se utilizou o papel de filtro como substrato.

Pires *et al.* (2001) aplicaram extrato de leucena (*Leucaena leucocephala*) em plantas daninhas e verificaram que o efeito fitotóxico foi menor em solo quando comparado com o papel de filtro.

Segundo Almeida (1988) e Reigosa *et al.* (1999) mudanças na atividade de certos aleloquímicos ocorrem porque estes sofrem degradação por microrganismos no solo. Neste ambiente, a força de adsorção das micelas pode exercer papel importante, seqüestrando os possíveis aleloquímicos (Inderjit e Dakshini, 1999 *in* Ferreira e Áquila, 2000). A textura e a aeração do solo também interferem na atividade dos compostos químicos (Pires e Oliveira, 2001).

No bioensaio de crescimento observou-se que alguns resultados, provenientes dos extratos em concentrações menores (50%), apresentaram um estímulo no crescimento de plântulas de alface e rabanete tanto para a altura das plântulas quanto para o comprimento da raiz. Segundo Rice (1984) alguns compostos químicos, tem atividade alelopática inibitória em altas concentrações e em menores podem estimular o mesmo processo. Reigosa *et al.* (1999) explica este fato, afirmando que os aleloquímicos podem atuar em vários processos simultaneamente e ter uma resposta diferenciada para o mesmo ou para diferentes processos dependendo da concentração deste composto.

Lovett e Dulfield (1981) e Barbosa *et al.* (1997) também observaram efeito estimulante em menores concentrações e inibitório em maiores concentrações de aleloquímicos (benzilamina e compostos sintetizados), ambos no sistema radicular de duas espécies, *Linum usitatissimum* e *Sorgum bicolor*, respectivamente.

Ao analisar a resposta das plântulas sob influência dos extratos dos diferentes órgãos de *A. esperanzae*, observou-se que os extratos de folha foram inibitórios na germinação das sementes, porém os extratos de caule e raiz, em geral, inibiram o crescimento e causaram anormalidades nas plântulas. Este fato pode ter significado ecológico, uma vez que a liberação de aleloquímico pelas folhas pode inibir a germinação de sementes presentes no solo, e os aleloquímicos da raiz podem inibir o crescimento daquelas sementes que conseguiram germinar.

Pode-se dizer também que os extratos de *A. esperanzae* possuem atividade alelopática sobre sementes de alface e rabanete, e que possivelmente, esta espécie possa através desta atividade, influenciar a sucessão de plantas nos campos cerrados, já que esta é uma planta pioneira e se encontra amplamente distribuída em seu ambiente.

Segundo Reigosa *et al.* (1999) a sucessão pode ser afetada pela alelopatia, permitindo a permanência de espécies como pioneiras graças à liberação de aleloquímicos. Almeida (1988) e Pinã-Rodrigues e Lopes (2001) enfatizam esta relação em espécies de gramíneas forrageiras.

Análise química

O extrato de folha de *Aristolochia esperanzae* utilizado na análise química foi submetido à primeira partição líquido-líquido e pode-se observar que diante das frações obtidas (fração hexano, acetato de etila, η -butanol e aquosa) a fração acetato de etila foi aquela que apresentou atividade alelopática (Figura 20).

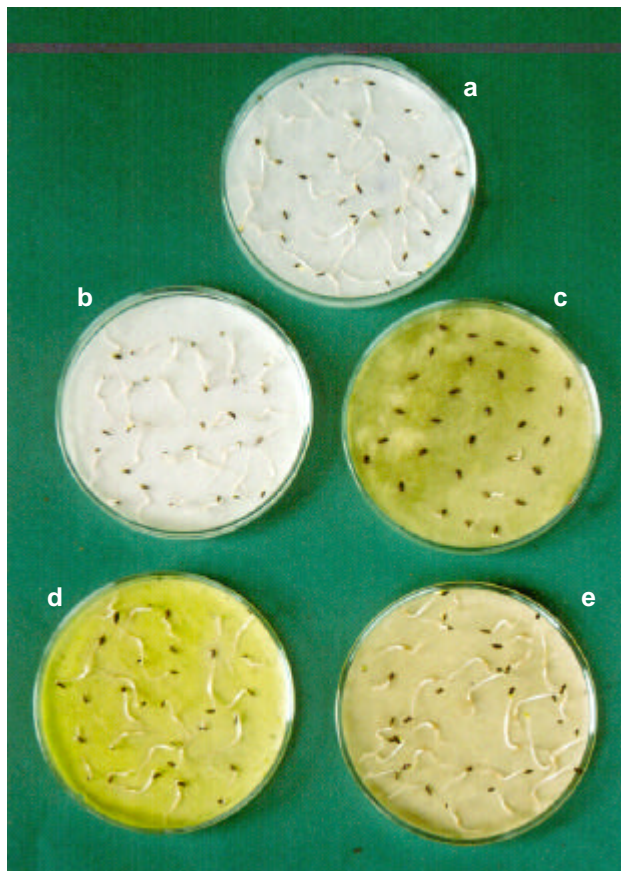


Figura 20 - Germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) quando colocadas na presença das frações obtidas do primeiro fracionamento (líquido-líquido): (a) controle; (b) fração hexano, (c) acetato de etila, (d) η -butanol e (e) aquosa. Foto tirada após sete dias da montagem do experimento. (Foto: Lima, M.I.S.).

Pela foto da figura 20 pode-se observar que mesmo depois de sete dias após da montagem do experimento nenhuma semente de alface havia germinado, evidenciando assim que esta fração pode conter substâncias com atividade alelopática, lembrando que as moléculas presentes nesta fração possuem similaridade (quanto à polaridade) às do solvente utilizado, que foi o acetato de etila.

Posteriormente, a fração acetato (a que apresentou atividade) foi submetida a um segundo fracionamento (cromatográfico a vácuo) e através deste fracionamento coletou-se um total de nove frações, nomeadas de A a I.

As frações H (metanol + 10% de água) e I (metanol + 20% de água), por apresentarem afinidade foram reunidas através da cromatografia de camada delgada, tornando-se apenas a fração H (metanol + 10 e 20% de água).

As frações de A a H foram submetidas ao teste de germinação com sementes de alface, e dentre as nove frações testadas apenas uma, a fração “E”, apresentou atividade biológica significativa, ou seja, inibiu a germinação das sementes. Mesmo após dez dias da montagem do experimento a fração “E” inibiu a germinação das sementes (Figura 21).

Após a verificação da atividade alelopática da fração “E”, esta foi submetida a um segundo fracionamento cromatográfico, utilizando coluna cromatográfica de vidro, como fase estacionária o polímero sephadex e como eluente o metanol. Obtiveram-se assim 72 frações (respectivamente numeradas), que foram monitoradas por cromatografia de camada delgada e, a partir de suas similaridades, foram reunidas obtendo-se 9 sub-frações: E. 1-10; E. 11-16; E. 17; E.18-24; E.25-29; E.30-38; E.39-44; E.45-69; E. 70-72.

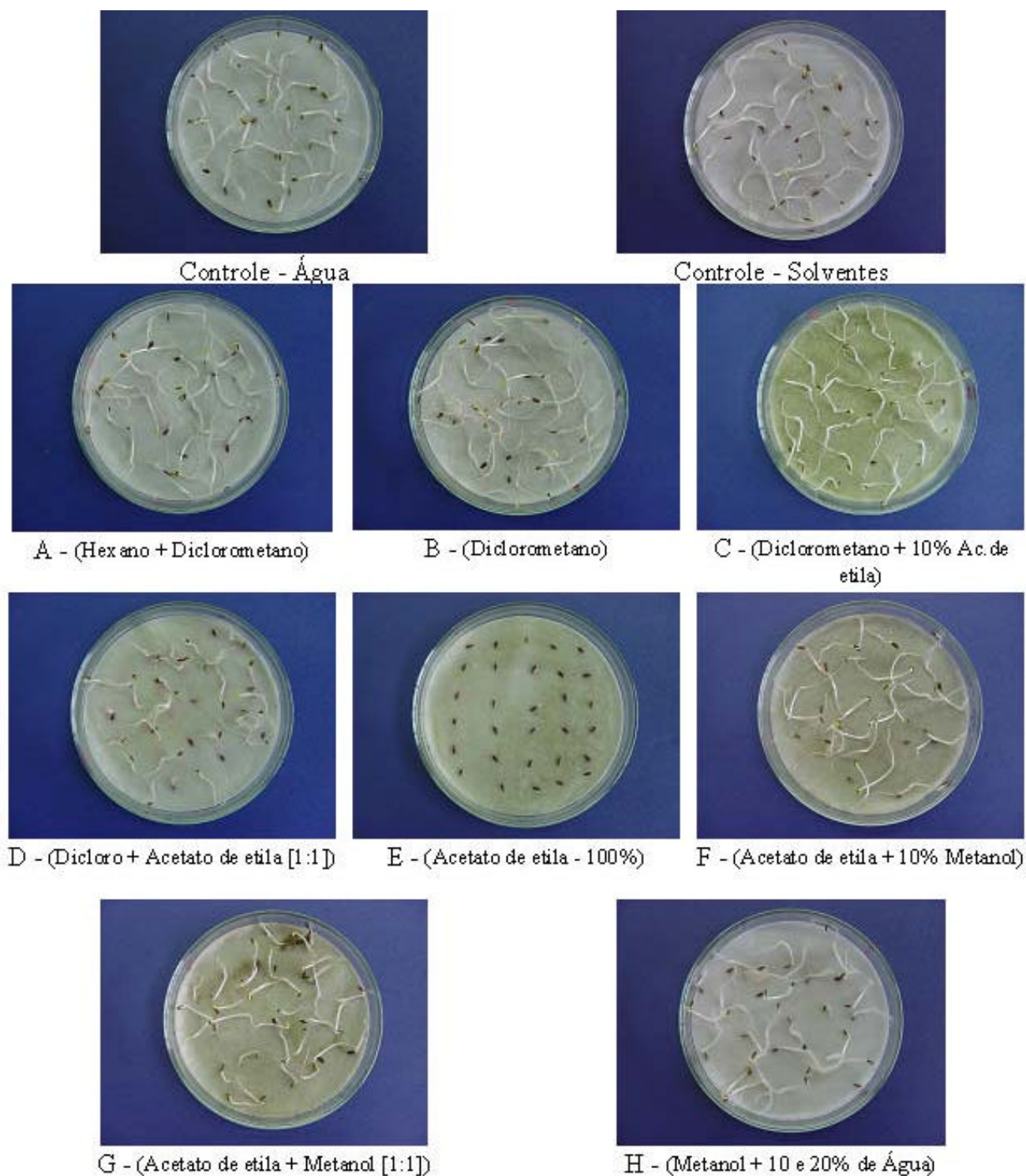


Figura 21 - Germinação de sementes de alface (*L. sativa*) quando colocadas na presença das frações obtidas do segundo fracionamento (cromatografia por adsorção, a vácuo): (Ca) Controle - água; (Cs) Controle - solventes; e as frações: (A) Hexano+ Diclorometano; (B) Diclorometano; (C) Diclorometano+10% Acetato de etila; (D) Diclorometano+Acetato de etila (1:1); (E) Acetato de etila; (F) Acetato de etila+10% metanol; (G) Acetato de etila+metanol (1:1); (H) Metanol+10% e 20% (de água). Foto tirada após dez dias da montagem do experimento. (Foto: Lima, M.I.S.).

Das nove sub-frações obtidas apenas três (E. 1-10; E. 11-16; E. 17) foram submetidas ao teste de germinação com sementes de alface, devido à baixa massa obtida no fracionamento, e a concentração obtida para cada uma foi de 4mg/mL. Dentre as três, a fração E. 11-16 apresentou atividade alelopática, inibindo completamente a germinação de quatro sementes de alface. Pode-se observar a diferença entre ela e as demais frações que proporcionaram apenas um atraso no crescimento se comparado com o controle, no detalhe (Figura 22). Esta foto (Figura 22) foi tirada após 10 dias da montagem do experimento. Notou-se ainda que mesmo após 18 dias a inibição da germinação das sementes de alface ainda foi mantida.

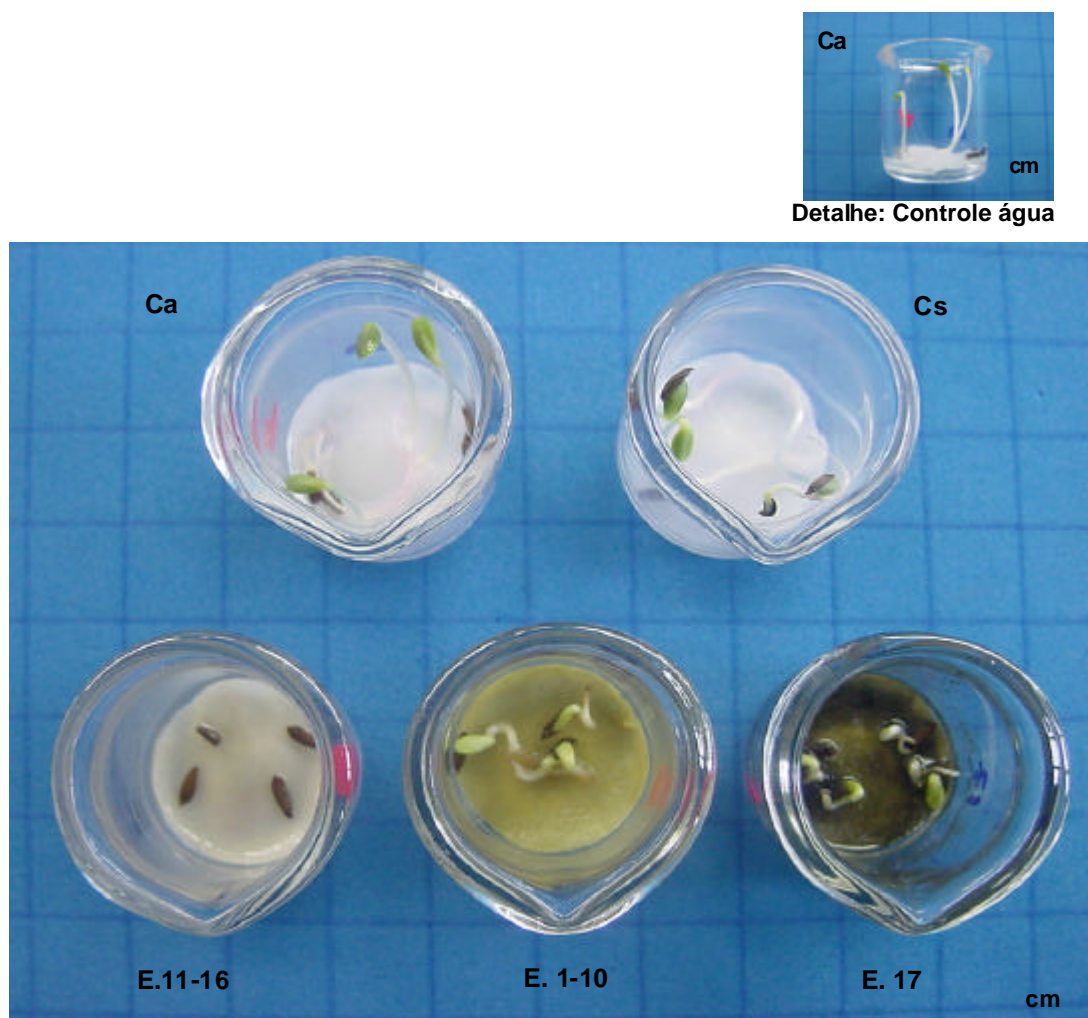


Figura 22 - Germinação de sementes de alface (*L. sativa*) quando colocadas na presença das frações obtidas do terceiro fracionamento (cromatografia por exclusão): Controles: água e solventes (Ca e Cs, respectivamente); fração E.1-10; fração E.11-16; fração E17 (com concentração de 4mg/mL). Foto tirada após dez dias da montagem do experimento. (Foto: Ortolan, R.L.).

Através dos dados preliminares de RMN ^1H , realizado com a fração E 11-16, observou-se uma mistura de compostos orgânicos, que indicam a presença de taninos e triterpenos (Figura 23). Possivelmente, estas classes de compostos sejam as principais responsáveis pela atividade alelopática apresentada nos testes biológicos com as sementes de alface.

A fim de se obter a substância pura desta mistura de compostos, pretende-se realizar novos fracionamentos a partir da fração E 11-16.

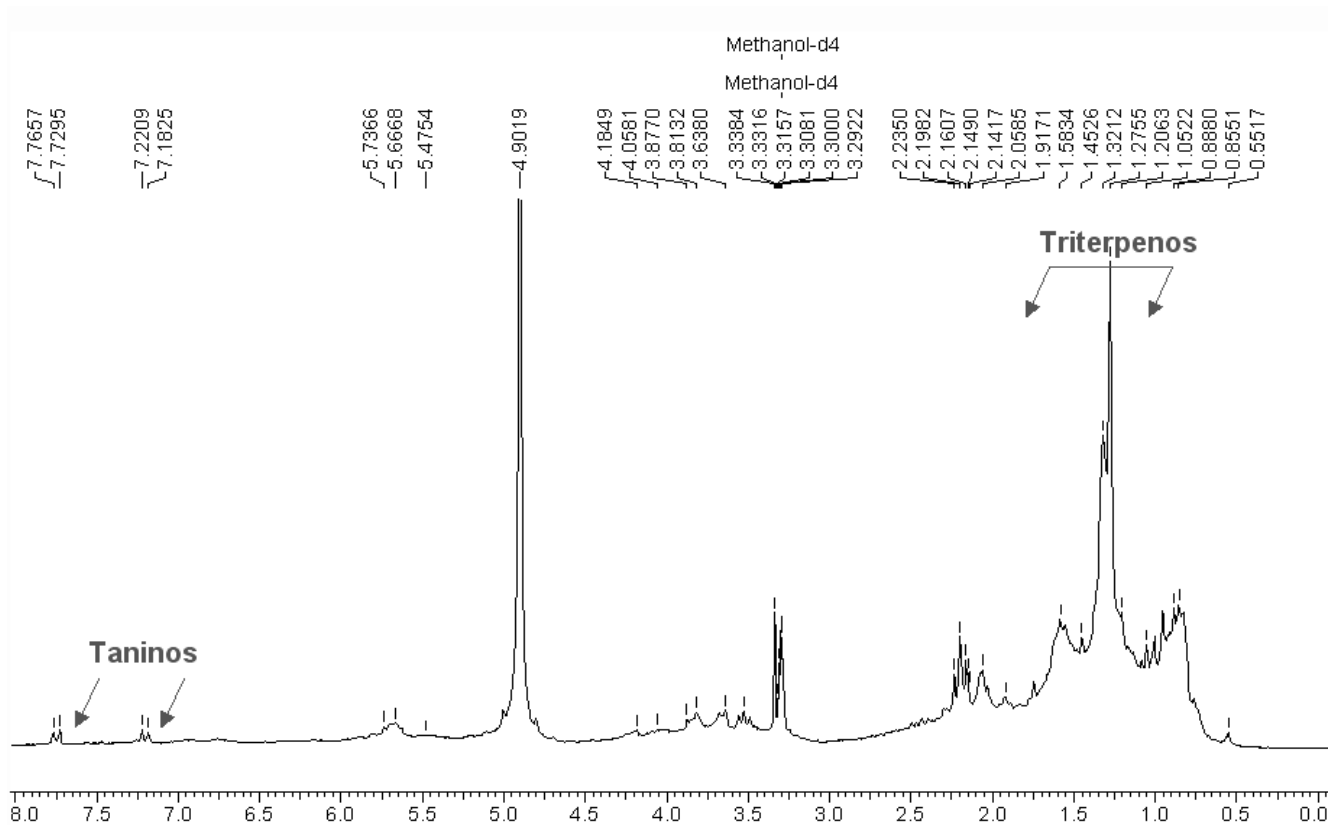


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H , obtido para a fração E 11-16 de *Aristolochia esperanzae*.

Harborne (1991) cita vários tipos de triterpenos presente nas plantas com funções ecológicas de defesa hormonal, contra herbívoros e nematóides. Fischer (1991) demonstrou que a ação alelopática muitas vezes, deriva dos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Fato que foi comprovado também por outros autores como Halligan (1975), Asakawa *et al.* (1980), Bhatt e Sabata (1989), Fischer *et al.* (1989 e 1990), Hiradate (1999), Macias *et al.* (2000), Nishimura *et al.* (2000) e Goto *et al.* (2001).

Priestap, *et al.* (1971), Lopes *et al.* (1987), Lopes e Bolzani (1988), Lopes *et al.* (1988) também evidenciaram a presença de terpenos e diterpenos, entre outras substâncias provenientes do metabolismo secundário de espécies de *Aristolochia*, incluindo a *esperanzae*.

Os taninos possivelmente interferem no crescimento de bactérias nitrificantes (Rice e Pancholy, 1974) e podem inativar a β -glucosidase das plantas, podendo causar inibição do crescimento e da germinação de sementes (Spencer, 1987 citado por Rawat *et al.*, 1998).

Rawat *et al.* (1998) observaram que os taninos de *Prunus armeniaca* proporcionaram inibição de crescimento e da germinação de sementes de *Triticum aestivum*. Estes autores indicaram que esta inibição seja proveniente de alterações em vários processos metabólicos das plantas, como a inibição da síntese de ATP e inibição de mecanismos de fosforilação.

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

As características físico-químicas obtidas para os extratos de *A. esperanzae* variaram de 5.1 a 5.62 para pH e de 54 a 145 mOsm/Kg para potencial osmótico.

Os extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto apresentaram valores de pH de 5.1, 5.23, 5.62, 5.27 e 5.5, respectivamente. Através destas medidas, verifica-se que não houve muita variação para os diferentes extratos provenientes dos órgãos de *A. esperanzae*, podendo-se notar que estes valores indicam baixa acidez, próximos aos obtidos por Aquila (2000) que encontrou variação de pH entre 5.1 e 6.4 para extratos de *Ilex paraguariensis*.

b) Potencial osmótico

Para o parâmetro de potencial osmótico os valores obtidos tiveram uma alta variação entre os extratos provenientes dos diferentes órgãos de *A. esperanzae*, com os valores: 145, 77, 54, 91 e 107 mOsm/Kg para os extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto, respectivamente. Estes valores convertidos para MPa correspondem a -0.35, -0.19, -0.13, -0.22 e -0.23 MPa, respectivamente, onde o maior valor foi obtido para o extrato de folha, e o menor para o extrato de raiz.

c) Experimento com PEG

Quando colocadas para germinar em soluções de PEG-6000, as sementes de alface e rabanete responderam diferentemente uma da outra. As soluções de

PEG-6000 utilizadas foram preparadas com os seguintes potenciais osmóticos: 0 (controle), -0.2, -0.3, -0.4 MPa. Depois de três dias em que as sementes foram colocadas para germinar, observou-se que todas as sementes de rabanete germinaram em todos os potenciais osmóticos. No entanto, 100% das sementes de alface germinaram apenas nos potenciais de 0 (controle) e -0.2 MPa. Na solução de -0.3 e -0.4 MPa germinaram 33 e 20% das sementes. Este resultado se manteve até o 7º dia após a montagem do experimento.

O potencial osmótico obtido para o extrato da folha de *A. esperanzae* foi de -0.35 MPa, este valor sugere uma possível interferência nos resultados de germinação das sementes de alface, no entanto, utilizando frações purificadas deste extrato (como descrito na análise química) a presença de atividade alelopática foi confirmada.

Os potenciais osmóticos obtidos para os demais extratos provenientes dos outros órgãos (caule, raiz, flor e fruto) de *A. esperanzae* variaram de -0.13 a -0.23 MPa. Considerando que soluções com potenciais osmóticos próximos de -0.2 MPa não interferem significativamente na germinação das sementes de alface e rabanete, pode-se inferir que a redução na velocidade e porcentagem de germinação destas sementes (Figuras 9 e 10) tenha acontecido principalmente pela presença de atividade alelopática nestes extratos.

Nos bioensaios de crescimento, as respostas obtidas para os parâmetros estudados (parte aérea, comprimento radicular e massa seca) podem ser resultantes da interação de alguns fatores adicionais à atividade alelopática, como por exemplo, a os potenciais osmóticos dos extratos, além das características físicas e químicas dos substratos, que podem interagir com os extratos. Segundo (Inderjit e Dakshini, 1999 citados por Ferreira e Áquila, 2000) em solos, a força de adsorção das micelas pode exercer papel importante, seqüestrando os possíveis aleloquímicos. A textura e a aeração do solo também interferem na atividade dos compostos químicos (Pires e Oliveira, 2001).

Conclusões

Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando extratos de *Aristolochia esperanzae* pode-se inferir que:

- Os extratos aquosos de folha foram os que provocaram maior inibição da germinação das sementes de alface e rabanete.
- Todos os extratos e concentrações retardaram a germinação de sementes de alface e rabanete.
- Os extratos de caule e raiz (50 e 100%) causaram anormalidade nas plântulas de alface e rabanete, e em alguns casos, na concentração de 100%, também provocaram mortalidade.
- A utilização da fibra de coco foi mais adequada que o papel de filtro na avaliação do crescimento inicial das plântulas de alface e rabanete, devido às suas características físicas, proporcionando uma melhor sustentação das plântulas.
- Com o uso de papel de filtro umedecido com os diferentes extratos observou-se maior efeito inibitório no crescimento das plântulas, se comparado com a fibra de coco.
- Entre os extratos de maior concentração (100%), o de folha foi o que menos inibiu o crescimento das plântulas, e na maioria dos casos o de raiz foi o que mais inibiu.
- A concentração dos extratos foi a principal responsável pelo estímulo ou inibição causada no crescimento das plântulas de alface e rabanete.
- Além da atividade alelopática, em alguns casos, pode ter ocorrido interferência adicional devido às características físico-químicas (pH e potencial osmótico) dos extratos e dos substratos.
- A partir dos resultados obtidos nas análises químicas pode-se indicar a presença de taninos e triterpenos como responsáveis pela atividade alelopática desta espécie.

Desta forma pode-se concluir que a espécie *A. esperanzae* apresentou atividade alelopática na germinação das sementes e crescimento das plântulas de alface e rabanete.

Referências

- AQUILA, M.E.A. Efeito alelopático de *Ilex paraquariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, n. 53, p. 51-66, ago., 2000.
- ALMEIDA, F.S. **A alelopátia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (Circular IAPAR, 53).
- BAGCHI, G.D.; JAIN, D.C.; CIMAP, P.O. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1131-1133, 1997.
- BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; BORGES, E.E.L.; MANN, J. Synthesis and evaluation of the plant growth regulatory activity of 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one derivatives. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 1, p. 19-27, 1997.
- BARUAH, N.C.; SARMA, J.C.; SARMA, S.; SHARMA, R.P. Seed germination and growth inhibitory cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1885-1892, 1994.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento da plantas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CAPELLARI, L.J. **Espécies de *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo**. Campinas, Universidade de Campinas, 1991. (Dissertação de Mestrado).
- CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. (Cap. 4). In: PUTNAM, A.R. e TANG, C.S. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley e Sons, 1986, p. 57-73.
- CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 609-636, 1999.

- CHOU, C.H.; FU, C.Y.; LI, S.Y.; WANG, Y.F. Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 12, p. 2131-2150, 1998.
- DELACHIAVE, M.E.A.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Efeitos alelopáticos de grama-seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 194-197, 1999a.
- DELACHIAVE, M.E.A.; RODRIGUES, J.D.; ONO, E.O. Efeitos alelopáticos de losna (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 265-269, 1999b.
- DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre a alelopatia**, Jaboticabal: FUNEP, 1993. 28 p.
- EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 171-188.
- EINHELLIG, F.A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 886-893, Nov./Dec., 1996.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição Especial.
- FERRI, M.G. **Plantas do Brasil: Espécies do cerrado**. São Paulo: Editora Edgard Blucher; EDUSP, 1969. 239 p.
- FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, J; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 629-644.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, n. 1, p. 28-44, Jan. /Mar., 1995.
- JUAN JIMÉNEZ-OSORNIO, F.M.V.Z.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides*. L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 1996.

- KATO-NOGUCHI, H. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of *lemon balm*. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 419-423, 2003.
- KHAN, Z.R.; HASSANALI, A.; OVERHOLT, W.; KHAMIS, T.; HOOPER, A.M.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Control of witchweed *Striga hermonthica* by intercropping with *Desmodium* spp., and the mechanism defined as allelopathic. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 9, Sept., 2002.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.
- LABOURIAU, L.G. A germinação de sementes. Washington: OEA, 1983. 173 p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Editora RiMa, 2000. 531 p.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V. Irodane diterpenes from *Aristolochia* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 10, p. 2781-2784, 1987.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. **Phytochemistry**, vol. 27, n. 7, p. 2265-2268, 1988.
- LOPES, L.M.X.; BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V. Lignans from Brazilian *Aristolochiaceae*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 19, n. 3-4, p. 113-117, 1988.
- LOVETT, J.V.; DUFFIELD, A.M. Allelochemicals of *Camelina sativa*. **Journal of Applied Ecology**, v. 18, p. 283-290, 1981.
- MEDEIROS, A.R.M.; LUCCHESI, A.A. Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 9-14, jan., 1993.
- NISHIMURA, H.; MIZUTANI, J. Identification of allelochemicals in *Eucalyptus citriodora* and *Polygonum sachalinense*. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Ed.). **Allelopathy - organisms, processes and applications**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 74-85.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 130-136, jan/dez., 2001.

- PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA FILHO, I.A.; OLIVEIRA JR, R.S.; FARIA, T.C.L. Atividade alelopática da Leucena sobre espécies da plantas daninhas. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 61-65, jan./mar., 2001.
- PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Editora Agropecuária, 2001, p. 145-185.
- PRIESTAP, H.A.; RUVEDA, E.A.; MASCARET, O.A.; DEULOFEU,V. Aristolochic acids from aristolochia-argentina gris and *Aristolochia esperanzae* O. kuntze. **Anales de la Asociación Química Argentina**, v. 59, n. 3-4, p. 245, 1971.
- PUTNAM, A.R. ; TANG, C.S. Allelopathy: state of the science. In: _____. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 1-19.
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 26, p. 13-23, 1998.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984. 353 p.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ- UNESP/FUNEP, 1992. 18 p. (Boletim).
- SAXENA, A.; SINGH, D.V.; JOSHI, N.L. Autotoxic effects of pearl millet aqueous extracts on seed germination and seedling growth. **Journal of Arid Environments**, v. 33, p. 255-260, 1996.
- SEIGLER, D. S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 876-885, Nov./Dec., 1996.
- VACCARINI, C.E.; BONETTO, G.M. Selective phytotoxic activity of withanolides from *lochroma australe* to crop and weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2187-2196, 2000.
- VACCARINI, C.E.; PALACIOS, S.M.; MERAGELMAN, K.M.; SOSA, V.E. Phytogrowth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 227-230, 1999.

- VILES, R.N.; REESE, R.N. Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, n. 1, p. 39-43, 1996.
- VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, nov/dez., 1991.
- WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 860-866, Nov./Dec., 1996.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2141-2154, 2000.
- YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1031-1032, 1995.
- YAMADA, K.; ANAI, T.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationship of lepidimoide and its analogues. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 671-673, 1996.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-2, 1998.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ocotea odorifera* (VELL) ROHWER NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Lactuca sativa* L. E *Raphanus sativus* L.

*“Posso não concordar com todas as palavras que tu dizes,
mas defenderei até o fim o teu direito de dizê-las.”*

Voltaire

Resumo

(Atividade alelopática de extratos aquosos de *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.). O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de extratos aquosos de diferentes órgãos de *Ocotea odorifera* na germinação e crescimento de alface e rabanete. Todos os extratos preparados obedeceram à proporção de 100g de material vegetal para 300 mL de água destilada, que produziu o extrato considerado 100% concentrado. A partir deste, foram feitas diluições com água destilada para 75, 50 e 25%. Nos testes de germinação foram avaliados os efeitos dos extratos obtidos de folha, caule, raiz a 100, 75, 50 e 25% e para o teste de crescimento apenas nas concentrações de 100 e 50%. Nos testes de germinação foram utilizadas quatro repetições de 30 sementes distribuídas em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL dos referidos extratos, secas durante 12 horas e reumedecidas com 4,5 mL de água destilada. No primeiro teste avaliou-se a porcentagem e velocidade de germinação das sementes. No teste de crescimento, as sementes foram previamente germinadas (2-4 mm de radícula) e depois transferidas para caixas plásticas contendo os substratos papel de filtro e fibra de coco umedecidos com os respectivos extratos. Avaliou-se a altura das plântulas, o comprimento radicular, a massa seca das plântulas, e a presença de anormalidades nas plântulas. Os testes foram mantidos a temperatura constante de 27°C. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que os extratos de folha foram os que mais afetaram a porcentagem de germinação e que todos os extratos e as diferentes concentrações retardaram a germinação de sementes de alface. As plântulas crescidas no substrato papel de filtro apresentaram maior inibição do crescimento, em relação àquelas crescidas no substrato fibra de coco, e o substrato foi o principal responsável pelo estímulo ou inibição causada no crescimento das plântulas de alface e rabanete.

Palavras-chave - alelopatia, *Ocotea*, alface, rabanete.

Abstract

(Allelopathic activity of aqueous extracts of *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L.). The objective of this work was analyze the effects of aqueous extracts of *Ocotea odorifera* organs in the germination and early growth of lettuce and radish. All the prepared extracts obeyed the ratio of 100g of plant material + 300 mL of distilled water to produce an extract 100% concentrated. This extract was diluted with distilled water to produce final concentrations of 75, 50 and 25%. In the germination tests the extracts of leaf, stem, root, with concentration of 100, 75, 50, 25% were evaluated. In the seedlings growth the concentration of 100 and 50% were used. In the germination tests, four replicates of 30 seeds were distributed in Petri dishes with two filter paper moistened with 5 mL of the extracts, dried during 12 hours and moistened again with 4,5 mL of distilled water. In the first test, the rate and germination percentage were evaluated. In the growth test, the seeds were previously germinated (2-4mm root length) and transferred to plastic boxes containing the filter paper or coconut fiber, moistened with the extracts. The aerial part height, root length, dry mass and the presence of abnormalities in the seedlings were evaluated. Both tests were maintained at constant temperature (27°C). The obtained results showed that the leaf extracts affected strongly the germination percentage and all the extracts, in different concentrations, delayed the germination of lettuce seeds. The seedlings grown in filter paper presented larger growth inhibition in relation to seedlings from coconut fiber, and the choice the filter paper or coconut fiber was the main responsible for the incentive or inhibition caused on lettuce and radish seedlings growth.

Key words - allelopathy, *Ocotea*, lettuce, radish.

Introdução

O termo alelopatia foi criado por Molisch em 1937 para designar todo efeito prejudicial ou benéfico entre uma planta e outra, através de interações bioquímicas (Rice, 1984).

Harborne (1997) sugere que os metabólicos secundários tenham função defensiva, ajudando o crescimento da planta que o emite. E ainda, que estes compostos possuem função ecológica de defender a planta contra herbívoros, atuam também como atrativos para polinizadores, ferormônio, além da ação alelopática, (Harborne, 1991).

Segundo Ferreira e Aquila (2000) o fato da maioria das espécies lenhosas serem perenes, estando expostas às instabilidades do ambiente por longos períodos, favorece o desenvolvimento destes metabólicos secundários para sua proteção contra a maioria dos ataques. Para estes autores, as espécies lenhosas possuem aspectos bastante importantes quanto à relação com a alelopatia, uma vez que possuem interação continuada, por longo período, com a microflora do solo e os possíveis aleloquímicos, e além disso, estas espécies possuem tempo de decomposição de casca e outros elementos lenhosos, muito mais longo que de folhas, frutos e flores.

Para que o efeito dos aleloquímicos sejam persistentes e atuantes, estes compostos devem ser libertados no ambiente em quantidades suficientes, ou persistirem por algum período de tempo no solo ou ser constantemente liberados para afetar as plantas vizinhas. (Putnam e Tang, 1986).

Uma vez liberados no ambiente, os aleloquímicos podem interferir na conservação, dormência e germinação de sementes, crescimento de plântulas e vigor vegetativo de plantas adultas por atuarem em funções vitais como respiração, divisão celular, nutrição e reprodução (Almeida, 1988).

Pela enorme variedade de aleloquímicos existentes, alguns podem com suas atividades favorecer ou prejudicar certas espécies, influenciando na composição específica e quantitativa das comunidades florísticas, tanto no espaço quanto no tempo (Durigan e Almeida, 1993).

As substâncias alelopáticas podem ser inibidores de germinação e do crescimento, pois interferem na divisão celular, na permeabilidade de membranas,

na ativação de enzimas e na produção de hormônios nas plantas (Rodrigues *et al.*, 1992).

A ação de vários aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas (Juan Jiménez-Osornio *et al.*, 1995; Viles e Reese, 1996; Rawat *et al.*, 1998; Vaccarini *et al.*, 1998). Porém, alguns trabalhos demonstraram que estes compostos podem atuar como promotores de crescimento (Hasegawa *citado por* Yamada *et al.*, 1996, Yamada *et al.*, 1995 e Yokotani-Tomita *et al.*, 1998).

Assim, o conhecimento dos efeitos alelopáticos de várias substâncias é muito importante para se entender as interações entre espécies de plantas tanto em ecossistemas naturais como nos ecossistemas agrícolas. (Rodrigues, *et al.* 1992).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi:

a) investigar atividade alelopática de diferentes concentrações de extratos de folha, caule, e raiz, fruto e flor de *Ocotea odorifera* na germinação e no crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.).

b) avaliar a possibilidade de utilização do papel de filtro e da fibra de coco como substratos para avaliação do crescimento de plântulas, sob a ação dos extratos aquosos.

Considerações sobre a espécie

Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer é uma espécie pertencente à família Lauraceae. Árvore medindo de 15 a 25 metros de altura, possui uma copa densa e arredondada, folhas medindo de 7 a 14 cm de comprimento (Figuras 24, 25). Esta espécie ocorre desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, na floresta fluvial atlântica, podendo ser encontrada também nos campos de altitude da Serra da Mantiqueira em São Paulo e Minas Gerais e, nas matas de pinhais do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. (Lorenzi, 2002).

Conhecida popularmente por canela-sassafrás, sassafrás, sassafrás-amarelo, canela parda, canela cheirosa, todas as partes da planta apresentam cheiro característico pela presença de óleo essencial safrol (Lorenzi, 2002). No meio do século passado a canela-sassafrás foi muito explorada para extração do “óleo de sassafrás”. Alguns trabalhos da época como os de Hickey (1948), Gottlieb e Magalhães (1960), Mollan (1961a e 1961b) estudaram a composição química, variações do óleo de sassafrás, além da variação da quantidade encontrada nesta espécie. Sendo assim, Hickey (1948) indicou a presença de cineole, eugenol, safrol, entre outros compostos. Mollan (1961b) também indicou em seu trabalho, que o óleo obtido da madeira da canela é muito rico em safrol, contendo também cânfora.

A *Ocotea odorifera* é considerada uma espécie, segundo a categoria de ameaça, rara no Estado do Paraná, e em perigo no Estado de São Paulo, este índice é dado pelas respectivas Secretarias do Meio Ambiente de seus Estados, sendo assim pertencente à lista da flora ameaçada de extinção do Brasil (Base de Dados Tropical, 2000). Segundo Backes e Irgang (2002) é uma espécie frutífera para macacos, pássaros e roedores (Figura 26) e possui importância também em projetos de regeneração e adensamento de vegetação secundária ou floresta parcialmente destruída.



Figura 24 - Árvore de *Ocotea odorifera*. (Foto: Ortolan, R.L.).



Figura 25 - Detalhe das folhas de *Ocotea odorifera*. (Foto: Ortolan, R.L.).



Figura 26 - Detalhe dos frutos de *Ocotea odorifera*. (Foto: Ortolan, R.L.).

Materiais e Métodos

Preparação dos Extratos

O material vegetal foi coletado de um indivíduo de *Ocotea odorifera* presente em uma área de cerrado pertencente ao 'Campus' da Universidade Federal de São Carlos.

A coleta foi realizada em maio de 2002 e o material foi mantido congelado até a realização dos experimentos. Os extratos aquosos da planta foram feitos utilizando-se folha, caule e raiz para os bioensaios de germinação e crescimento.

Para a obtenção dos extratos, o material vegetal foi primeiramente pesado, picado e em seguida, triturado com o auxílio de um liquidificador industrial durante cinco minutos, e deixado em repouso durante 30 minutos. Decorrido este período, o extrato foi filtrado em filtro de pano e em seguida, utilizou-se uma bomba elétrica a vácuo acoplada a um funil de Buchner recoberto com papel de filtro quantitativo para uma segunda filtragem. O material filtrado foi coletado em um frasco Kitazato e imediatamente utilizado.

Todos os extratos foram feitos obedecendo à proporção de 100 g de material vegetal para 300 mL de água destilada, sendo este considerado o extrato bruto (100% de concentração). A partir deste, foram feitas diluições com água destilada para 75, 50 e 25 %. O efeito destas quatro concentrações foi comparado com o da água destilada, considerada como controle (0%).

Rendimento

Calculou-se o rendimento dos extratos de folha, caule e raiz de *O.odorifera* nas quatro concentrações. Para tal, antes de adicionar cada extrato nas placas de Petri as folhas de papel de filtro foram pesadas (Peso I). Após ter adicionado 5 mL dos extratos nas placas e evaporados durante 12 horas, os papéis de filtro foram novamente pesados (Peso II), em balança analítica de precisão (mg) (Aquila, 2000).

A diferença entre as pesagens (Peso II - Peso I) dividido pelo volume utilizado mostra o rendimento de cada extrato (mg/mL), ou seja, quanto de material vegetal proveniente dos extratos foi necessário para inibir a germinação de 30 sementes de

alface ou rabanete. O rendimento total de cada extrato foi calculado através da média aritmética de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

No biensaio de germinação foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L, cultivar Grand rapids) e de rabanete (*Raphanus sativus* L, cultivar Crimson gigante). As sementes foram doadas pela empresa “Hortec Sementes Ltda”, com validade de junho de 2005 para as sementes de alface e de junho de 2004 para rabanete.

Para este experimento utilizou-se extrato de folha, caule e raiz, em quatro concentrações (25, 50, 75 e 100%) mais o grupo controle. Foram colocados 5 mL dos extratos em duas folhas de papel de filtro que forravam as placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As placas contendo os papéis de filtro, umedecidos com extrato, foram secas em capela com exaustor durante 12 horas. Decorrido este período, o papel de filtro foi reumedecido com 4,5 mL de água destilada.

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 30 sementes de alface ou rabanete por placa de Petri, mantidos em câmara climatizada (Estufa BOD) à 24°C, na ausência de luz. As sementes apenas receberam luz durante as contagens que foram realizadas em intervalos de 12 horas durante os sete primeiros dias e em intervalos de 24 horas até totalizar 10 dias após a semeadura.

As sementes foram consideradas germinadas quando estas apresentavam 2 mm de protrusão radicular (Brasil, 1992). A porcentagem (G), a velocidade (V) e tempo médio (t) de germinação foram calculados segundo as fórmulas (equação 3.1, 3.2 e 3.3 respectivamente) a seguir, citadas em Labouriau e Valadares (1976):

- Porcentagem de germinação

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

eq. 3.1

onde:

G = porcentagem de germinação

N = número de sementes germinadas

A = número total de sementes colocadas para germinar

- Velocidade de germinação

$$V = 1/t \quad \text{eq. 3.2}$$

onde:

V = velocidade média de germinação (dias⁻¹)

t = tempo médio de germinação

onde:

$$t = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \quad \text{eq. 3.3}$$

onde: n_i = número de sementes germinadas por dia

t_i = tempo de incubação (12 h / 24 h)

Análise estatística dos dados

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

Bioensaio de Crescimento

No biensaio de crescimento foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L, cultivar Grand rapids) e de rabanete (*Raphanus sativus* L, cultivar Crimson gigante).

Neste experimento utilizou-se extrato de folha, caule e raiz de *Ocotea odorifera* na concentração de 100% (100g de material vegetal para 300 mL de água destilada) e a partir desta concentração fez-se diluições com água destilada para 50%, onde ambas foram comparadas com o controle (água destilada).

Os experimentos foram realizados em caixas plásticas transparentes (11 x 29 x 9,5 cm) contendo dois tipos de substratos: papel de filtro e fibra de coco (substrato doado pela empresa "Amafibra - Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia - Grupo Socôco", composto de fibras do mesocarpo da casca de coco - *Cocus nucifera*). Cada caixa continha quatro repetições de 10 sementes em cada uma. Os extratos

foram colocados em contato com o substrato 12 horas antes da montagem do experimento para haver melhor absorção.

No substrato papel de filtro foram utilizadas duas folhas umedecidas com 38 mL de extrato e no substrato de fibra de coco foram colocadas 140 g de fibra por caixa, umedecida com 650 mL.

As sementes (alface e rabanete) foram previamente germinadas a 24°C, em placas de Petri, forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 4,5 mL de água. Após decorridas 45 horas, as sementes germinadas (apresentando entre 2 a 4 mm de radícula) foram transplantadas para as caixas plásticas, contendo os substratos umedecidos com extratos de folha, caule e raiz a 0, 50 e 100% de concentração. As caixas foram mantidas em câmara climatizada (Estufa BOD) à 24°C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas no 7º dia após a semeadura, com medições da altura da planta (mm) e o comprimento da raiz (mm). Tanto a medida da altura das plantas quanto o comprimento radicular são parâmetros biométricos descritos por Benincasa (1988), onde:

- Altura da planta – considerada a distância do colo da planta até o seu ápice.
- Comprimento radicular – (comprimento da raiz principal) - distância definida do colo da planta até o ápice meristemático do sistema radicular.

As plântulas foram classificadas em normais ou anormais, de acordo com as especificações de Brasil (1992), onde são consideradas anormais aquelas que não mostram potencial para continuar o seu desenvolvimento e não são consideradas anormais plântulas com pequenos defeitos como dano limitado ou pequeno retardamento no crescimento no sistema radicular. Assim, neste trabalho, foram consideradas anormais as plântulas com o sistema radicular ou aéreo apodrecidos, ausentes, totalmente atrofiados, ou em alguns casos, quando houve mortalidade das plântulas.

Depois de realizadas as medidas biométricas, as plântulas de cada repetição foram separadas em normais e anormais e colocadas em sacos de papel, mantidos em estufa à 80°C durante 48 horas até a estabilização do peso. Decorrido este período o material vegetal foi mantido em dessecador para ser pesado em balança analítica de precisão (com quatro casas decimais), obtendo-se assim os valores de massa seca total das plântulas (mg).

Análise estatística dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas duas a duas, com o uso do teste de Duncan a 5% de probabilidade, com a utilização do *software* 'Statistic 6'.

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

O pH de cada extrato utilizado nos bioensaios foi medido com o auxílio do pHmetro. Esta medição foi realizada com os extratos dos diferentes órgãos de *O. odorifera* em sua maior concentração, isto é, 100% (100g de material vegetal + 300 mL de água destilada).

b) Potencial osmótico

A medição de concentração molar foi realizada com um osmômetro (μ Osmotte, modelo 5004 automatic osmometer) onde foram utilizados 50 μ l de cada extrato mantido a temperatura de 24°C, essa medida foi expressa em mOsm/Kg. Os extratos submetidos à medição do potencial osmótico foram os extratos mais concentrados (100% de concentração) de folha, caule e raiz de *O. odorifera*.

Os valores de potencial osmóticos foram convertidos da unidade de mOsm/Kg para MPa, utilizando a equação 3.4 citada por Larcher (2000):

$$1 \text{ Osmol/Kg} = 0,00832 \times T_{\text{abs}} \text{ MPa} \quad \text{eq. 3.4}$$

onde:

T_{abs} - Temperatura absoluta, expressa em graus Kelvin.

c) Experimento com PEG

Para a determinação dos efeitos do potencial osmótico, realizou-se um experimento utilizando soluções de polietilenoglicol (PEG-6000) com diferentes valores de potencial osmótico: 0, -0.2, -0.3 e -0.4 MPa, segundo especificações de Villela (1991). Neste experimento, foram colocadas para germinar 30 sementes de alface e rabanete para cada repetição, mantidas a 24°C.

Resultados e Discussão

Rendimento

Analisando as medidas de rendimento obtidas para os diferentes extratos de *O. odorifera*, verifica-se que o extrato de folha apresentou maior valor de rendimento, em torno de 18.8 mg/mL, seguidos dos extratos de caule (9.8 mg/mL) e raiz (7.3 mg/mL), todos em suas maiores concentrações (Figura 27).

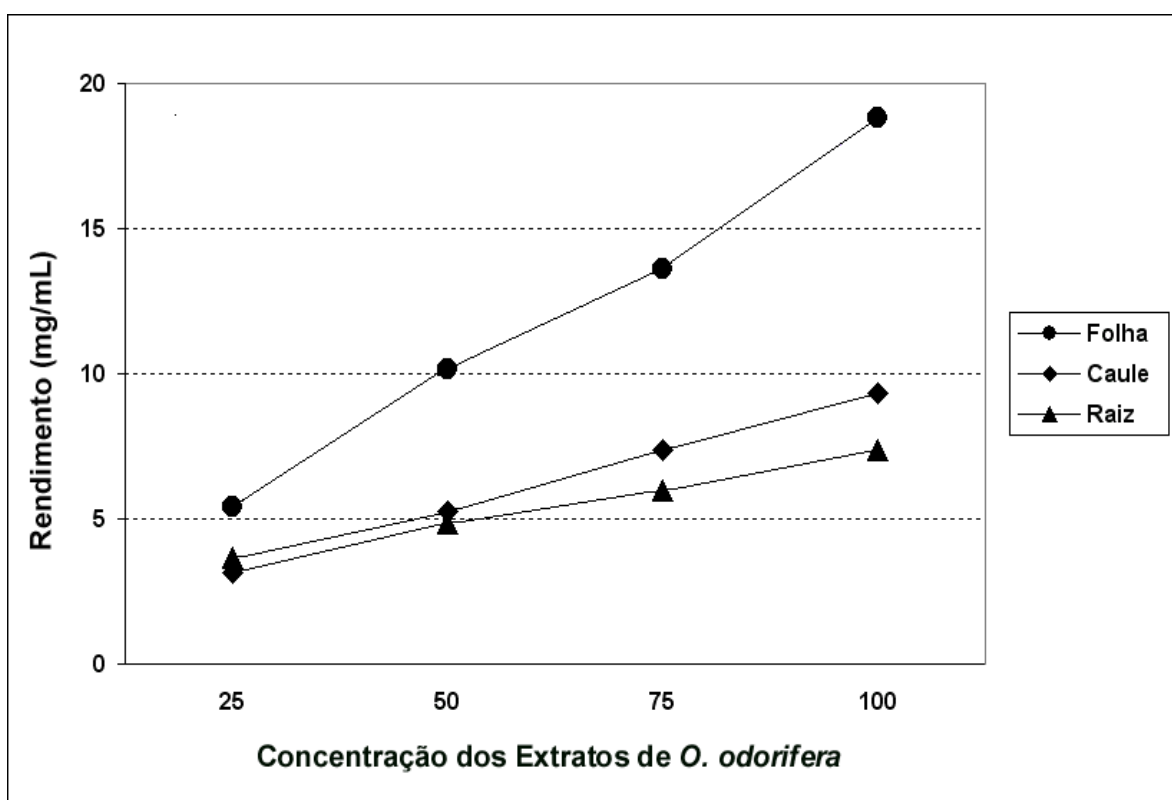


Figura 27 - Valores médios de quantidade de material vegetal (rendimento) obtido de 5 mL dos extratos de folha, caule, raiz, flor e fruto de *Ocotea odorifera*. Média de quatro repetições.

Bioensaio de Germinação

Quando foram comparadas as causas de variação, ou seja, órgãos (folha, caule e raiz) e concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) foi observado a presença de interação significativa para os dois parâmetros analisados (porcentagem e velocidade de germinação) das sementes de alface (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado da análise de variância para os parâmetros de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação dos diferentes extratos (órgãos) de *Ocotea odorifera* e suas diferentes concentrações.

Causas da variação	Porcentagem de germinação			Velocidade de germinação	
	G.L.	Quadrados Médios	Valores de F	Quadrados Médios	Valores de F
Órgãos (O)	4	858.3	13.78 ***	0.1290	159.3 ***
Concentração (C)	4	721.2	11.58 ***	0.2621	323.6 ***
Interação O x C	16	433.9	6.968 ***	0.01765	21.67 ***
Resíduo	75	62.27		0.0008098	
C.V.		10.1021		6.39141	

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

No entanto, para as sementes de rabanete houve interação entre as causas de variação somente para a porcentagem de germinação (Tabela 6). Sendo assim, os valores de velocidade de germinação destas sementes e suas médias totais foram comparados separadamente (órgãos e concentrações), onde apenas a concentração dos extratos influenciou a resposta de velocidade de germinação de rabanete.

Tabela 6 – Resultado da análise de variância para os parâmetros de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação dos diferentes extratos (órgãos) de *Ocotea odorifera* e suas diferentes concentrações.

Causas da variação	Porcentagem de germinação			Velocidade de germinação	
	G.L.	Quadrados Médios	Valores de F	Quadrados Médios	Valores de F
Órgãos (O)	4	26.96	86.32 ***	0.01305	2.151 n/s
Concentração (C)	4	657.9	21.06 ***	0.1736	28.62 ***
Interação O x C	16	275.1	8.806 ***	0,006441	1.062 n/s
Resíduo	75	31.24		0,006065	
C.V.		8.3734		15.4142	

* / ** - 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

A figura 28 apresenta os valores de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface quando germinadas em meio contendo os extratos de *O. odorifera*. Observa-se que os extratos de caule e raiz não causaram diferenças significativas na porcentagem de germinação das sementes de alface. Entretanto, o extrato de folha na concentração de 100% causou redução significativa. Resultados onde a dependência entre diferentes extratos e suas concentrações também foram obtidos por Pinã-Rodrigues (2001) quando sementes de *Tabebuia alba* foram germinadas na presença de extratos de *Mimosa caesalpinifolia*.

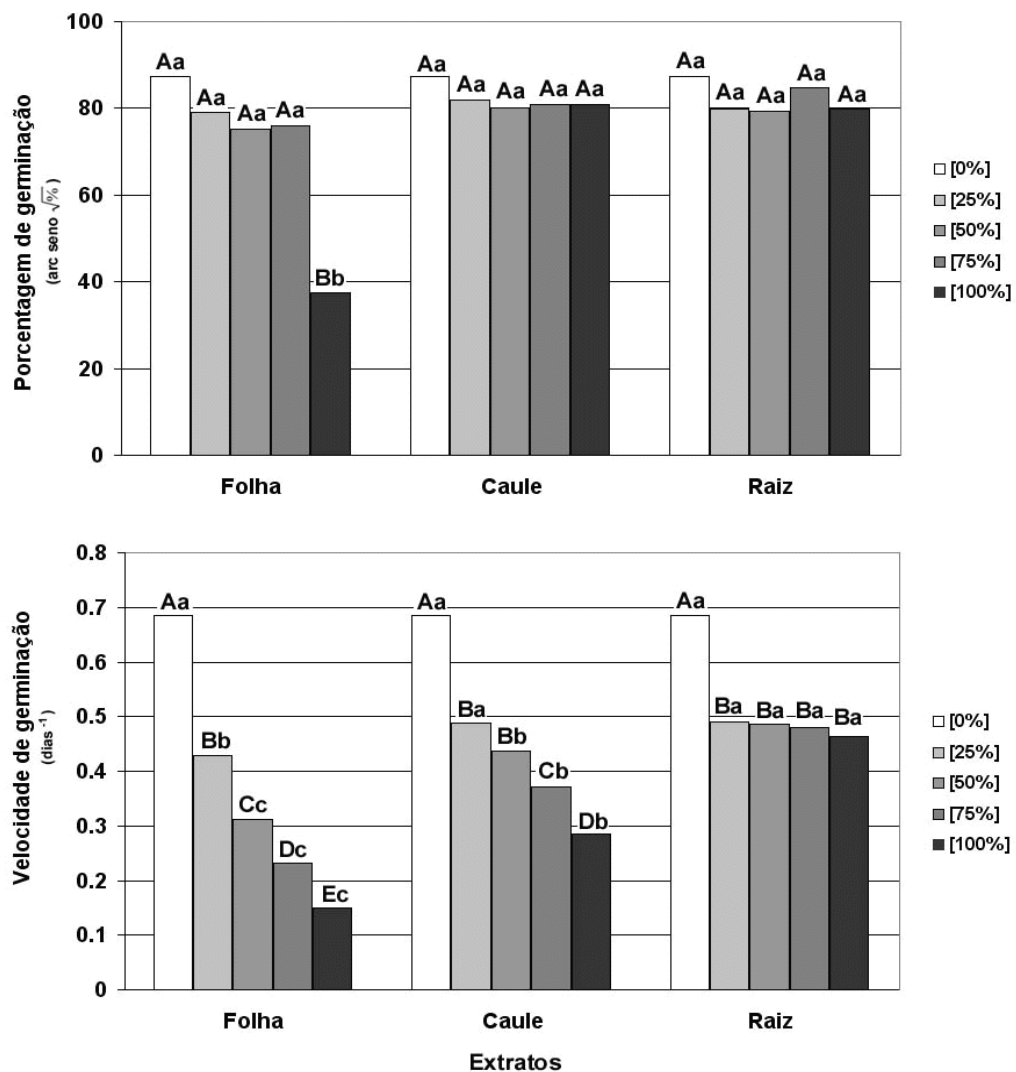


Figura 28 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação de diferentes extratos de *Ocotea odorifera* em quatro concentrações, mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à velocidade de germinação das sementes de alface, nota-se que mesmo os extratos de caule e raiz, que não causaram redução na porcentagem de germinação, causaram um atraso no processo germinativo das mesmas sementes.

O extrato de raiz causou diminuição na velocidade germinação das sementes a partir da concentração de 25% quando comparadas com o controle, e se manteve inalterada mesmo com o aumento da concentração dos extratos. No entanto, os extratos de folha e caule causaram em atraso no processo germinativo das sementes da alface, e percebe-se que há uma tendência de decréscimo nos valores de velocidade de germinação quando se aumenta a concentração dos extratos. Este resultado foi bastante nítido para o extrato de folha, onde se encontram também os menores valores de velocidade de germinação (Figura 28).

Na figura 29 pode-se observar os valores de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete quando colocadas para germinar em meios umedecidos com os extratos de *O. odorifera*.

Quanto à porcentagem de germinação das sementes de rabanete observa-se que, semelhante ao que ocorreu com as sementes de alface, o extrato de raiz não alterou significativamente este parâmetro. No entanto, o extrato de caule causou uma diminuição na porcentagem de germinação das sementes de rabanete e esta diminuição, difere estatisticamente do grupo controle a partir da concentração de 75% (Figura 29).

O extrato de folha foi o que mais inibiu a porcentagem de germinação de rabanete, semelhante ao que ocorreu com as sementes de alface, e esta redução foi significativamente diferente do grupo controle a partir da concentração de 25%. Este efeito foi acentuado nas concentrações de 75 e 100% (Figura 29). Este fato está de acordo com a afirmação de Moreira (citado por Paranhos, 1999), que enfatiza que a concentração de aleloquímicos é maior nas folhas, seguido do caule, das flores e por último, das raízes.

Os dados de velocidade de germinação, (diferente dos de porcentagem) quando submetidos à análise de variância (Tabela 6), não apresentaram interação significativa entre as causas de variação (órgãos: folha, caule, raiz e concentrações: 0, 50, 25, 75 e 100%), sendo assim, suas médias totais foram analisadas independentemente, uma da outra, pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

Quanto ao parâmetro de velocidade de germinação percebe-se que houve uma redução na velocidade de germinação das sementes de rabanete com o aumento da concentração dos extratos independente do tipo de extrato (se folha, caule ou raiz) e por outro lado, os diferentes extratos não causaram redução na velocidade de germinação das sementes de rabanete, independente da concentração utilizada (Figura 29).

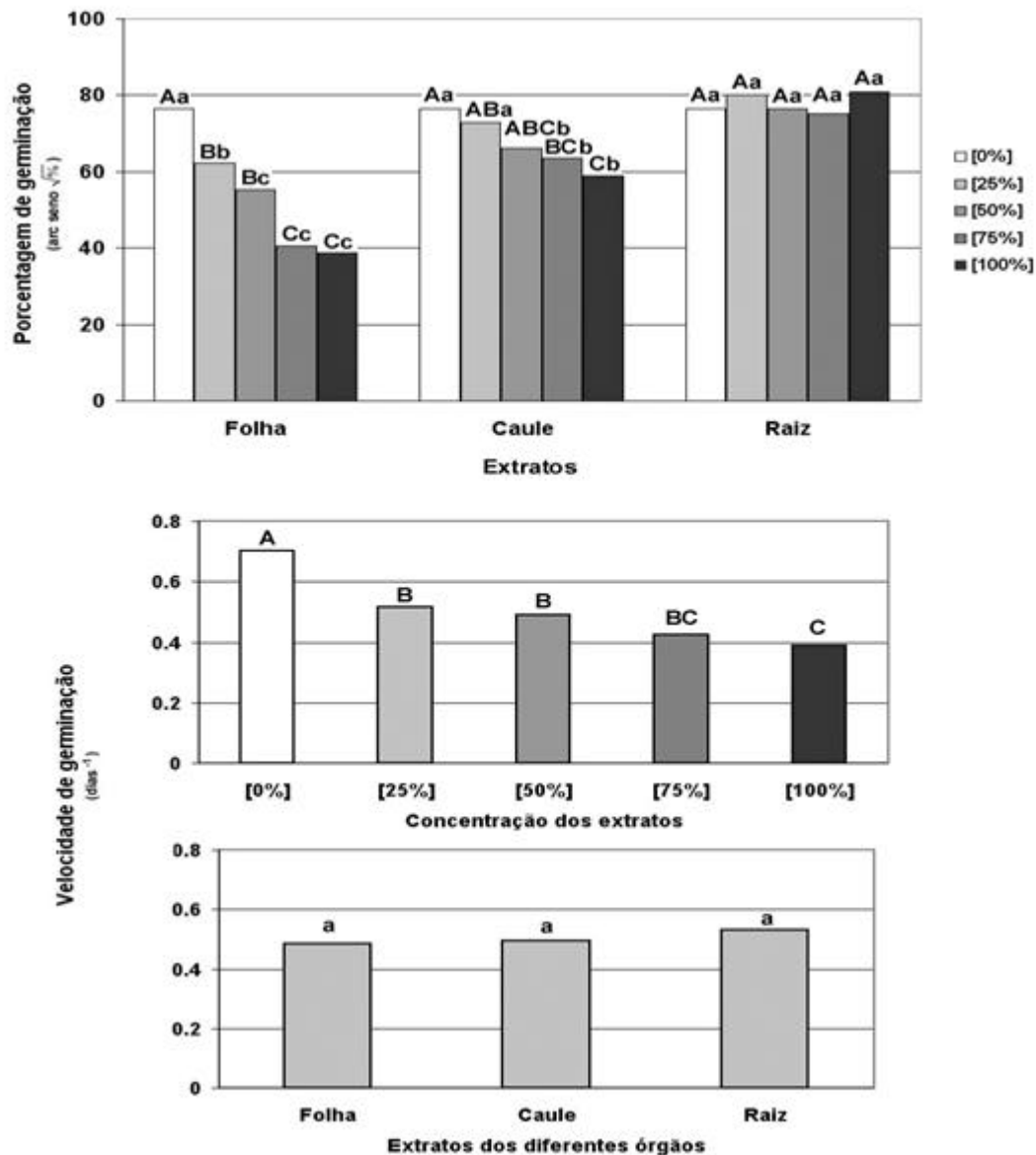


Figura 29 - Valores médios de porcentagem e velocidade de germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação de diferentes extratos de *Ocotea odorifera* em quatro concentrações, mais o controle (0%). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as concentrações e minúsculas para os órgãos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diante dos resultados de germinação das sementes de alface e rabanete, quando germinadas em meio contendo os extratos de *O. odorifera*, percebe-se que o extrato que proporcionou maior redução da porcentagem de germinação para ambas sementes foi o de folha, sendo que esta inibição foi maior principalmente na concentração de 100%.

No entanto, em outro trabalho onde foram utilizadas substâncias voláteis da folha de *O. odorifera* não foi constatada a inibição de germinação de sementes de alface (Borges *et al.*, 1993).

Para o parâmetro de velocidade de germinação, pode-se observar que os extratos provenientes dos três órgãos (folha, caule e raiz) causaram atraso na germinação das sementes de alface. Para as sementes de rabanete percebe-se uma dependência apenas da concentração dos extratos, independente do órgão testado, semelhante ao ocorrido com Paranhos (1999), onde mesmo testando dois compostos de raízes de *Himatanhus plagedaenicus* apenas a concentração destas substâncias foi a responsável pela inibição ou não da germinação de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*).

Bioensaio de Crescimento

Quando foram comparadas todas as causas de variação: substratos (fibra de coco e papel de filtro), diferentes órgãos (folha, caule e raiz) e concentrações (0, 50 e 100%) houve interação significativa para todos os parâmetros estudados (altura das plântulas, comprimento da raiz e massa seca total) para as plântulas de alface (Tabela 7).

Tabela 7– Resultado da análise de variância para os parâmetros parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de alface (*Lactuca sativa*) submetidas à ação dos diferentes extratos de *Ocotea odorifera*. Foram consideradas como causas de variação os órgãos e as concentrações dos extratos e o substrato onde foram crescidas as plântulas.

Causas da variação	Altura das plântulas			Comprimento da raiz		Peso seco total	
	G.L.	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F
Substrato (S)	1	1403.09	222.6 ***	2062.53	417.49 ***	0.01280	4.49 **
Órgão (O)	2	60.79	9.647 **	253.92	51.40 ***	0.01841	6.45 ***
Concentração (C)	2	116.16	18.434 ***	145.56	29.46 ***	0.03880	13.61 ***
Interação S x O x C	4	29.01	4,603 ***	27.87	5.64 ***	0.01152	4.04 **

* / **. 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Quando foram comparadas todas as causas de variação (substratos, diferentes órgãos e concentrações) para as plântulas de rabanete, foi registrada interação significativa para os parâmetros altura das plântulas e comprimento da raiz, o que não ocorreu para o parâmetro massa seca total (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultado da análise de variância para os parâmetros parte aérea, comprimento da raiz e massa seca total das plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) submetidas à ação dos diferentes extratos de *Ocotea odorifera*. Foram consideradas como causas de variação os órgãos e as concentrações dos extratos e o substrato onde foram crescidas as plântulas.

Causas da variação	Altura da Plântula			Comprimento da Raiz		Massa Seca Total	
	G.L.	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F	Quadrados médios	Valores de F
Substrato (S)	1	101.41	4.564 ***	7522.9	131.750 ***	9.739	016.087 ***
Órgão (O)	2	120.14	5.406 ***	1046.2	18.323 ***	0.597	0.986 n/s
Concentração (C)	2	103.18	4.643 ***	1386.8	24.287 ***	3.726	6.155 **
Interação S x O x C	4	301.90	13.586 ***	452.8	7.929 ***	0.173	0.286 n/s

* / **. 1% de probabilidade; *** - 5% de probabilidade; n/s - não significativo.

Anormalidade

Todas as plântulas analisadas e medidas, embora algumas apresentassem algum tipo de diferenciação de crescimento em relação ao controle, ou seja, menor crescimento radicular ou aéreo, nenhuma delas foi considerada anormal, pois não apresentavam características como apodrecimento, ausência do sistema radicular ou morte.

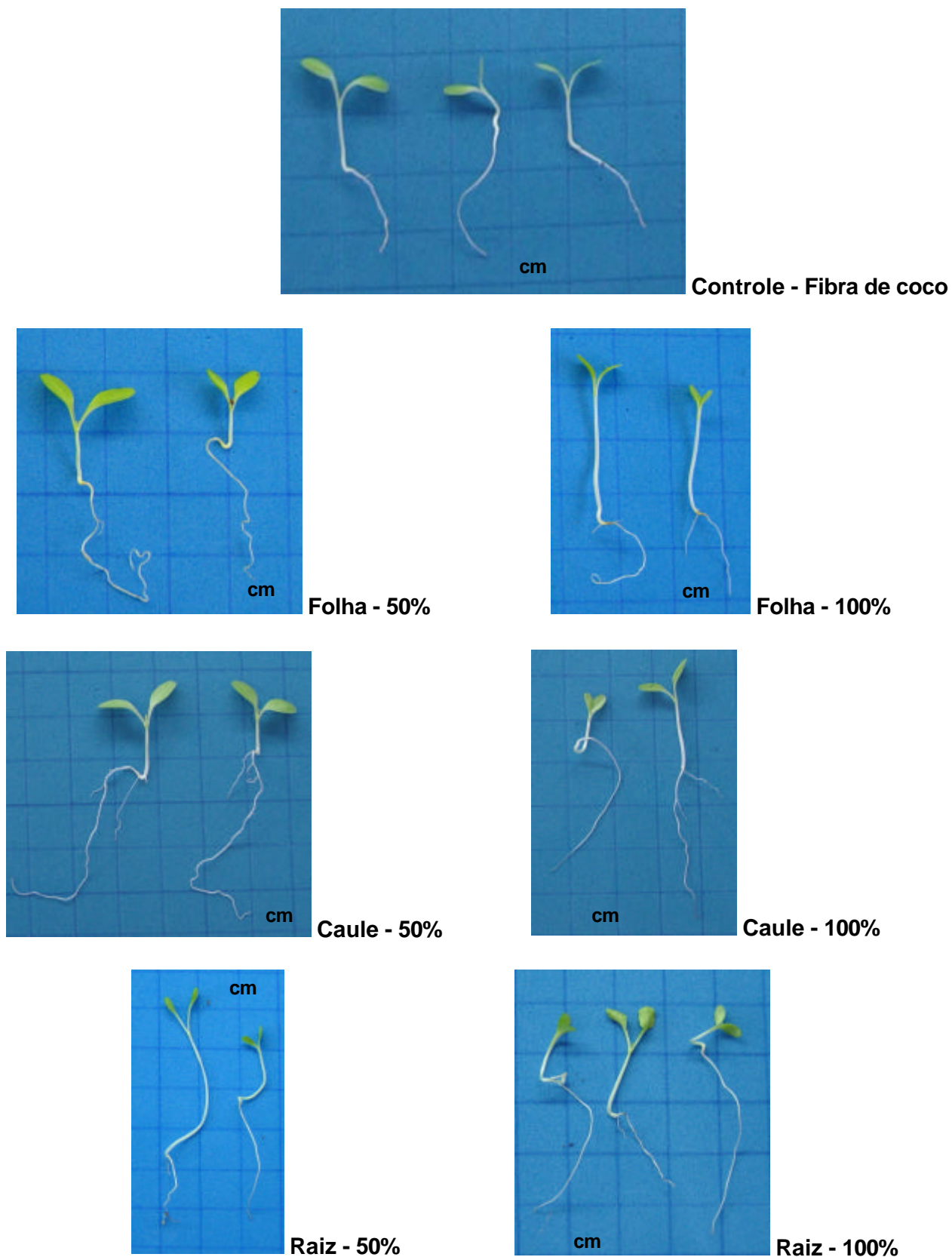


Figura 30 - Crescimento de plântulas normais de alface (*Lactuca sativa*) quando crescidas em fibra de coco umedecida com extratos de folha, raiz e caule de *Ocotea odorifera* em duas concentrações (50 e 100%) e com água (controle). (Foto: Casali, C.A.).

**Controle - Papel de filtro****Folha - 100%****Caule - 100%****Raiz - 50%****Raiz - 100%**

Figura 31 - Crescimento de plântulas normais de alface (*Lactuca sativa*) quando crescidas em papel de filtro umedecido com extratos de folha, raiz e caule de *Ocotea odorifera* em duas concentrações (50 e 100%) e com água (controle). (Foto: Casali, C.A.).



Controle - Fibra de coco

cm



Caule - 50%

cm



Caule - 100%

Figura 32 - Crescimento de plântulas normais de rabanete (*Raphanus sativus*) quando crescidas em fibra de coco umedecida com extratos de folha, raiz e caule de *Ocotea odorifera* em duas concentrações (50 e 100%) e com água (controle). (Foto: Casali, C.A.).

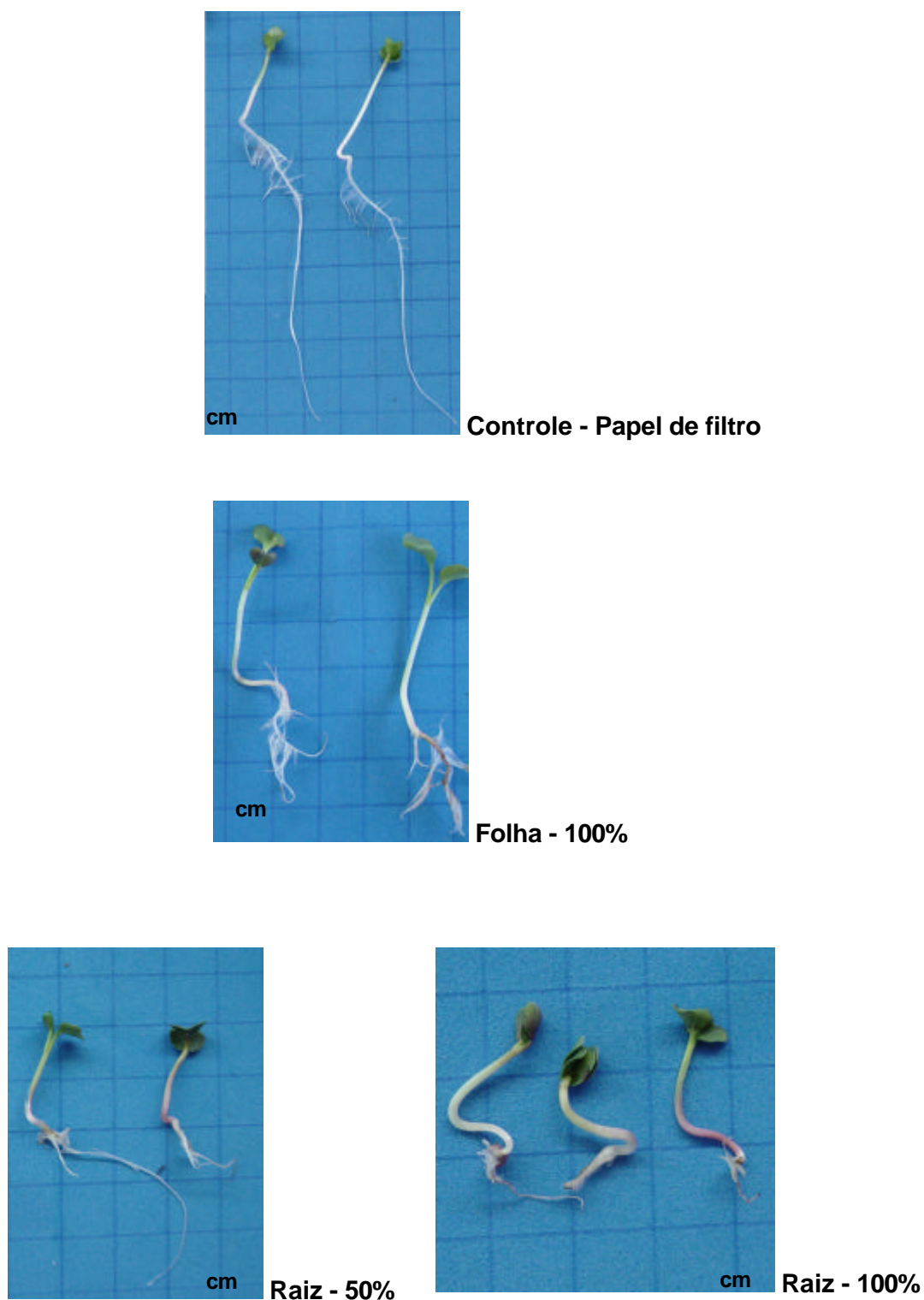


Figura 33 - Crescimento de plântulas normais de rabanete (*Raphanus sativus*) quando crescidas em papel de filtro umedecido com extratos de folha, raiz e caule de *Ocotea odorifera* em duas concentrações (50 e 100%) e com água (controle). (Foto: Casali, C.A.).

A Figura 34 apresenta os valores de altura das plântulas de alface crescidas na presença dos extratos de *O. odorifera*, no papel de filtro e na fibra de coco. Pode-se notar que os valores de altura de plântulas de alface foram maiores estatisticamente quando estas cresceram em fibra de coco, se comparadas com as crescidas em papel de filtro. (Figuras 30 e 31).

Na fibra de coco, os extratos de folha e caule, na concentração de 100%, e de raiz nas duas concentrações, causaram um estímulo no crescimento destas plântulas, quando comparadas com todos os extratos e com o grupo controle (Figuras 30 e 34). Os valores de altura das plântulas, crescidas em meio contendo os demais extratos, não diferiram estatisticamente do controle (Figura 35).

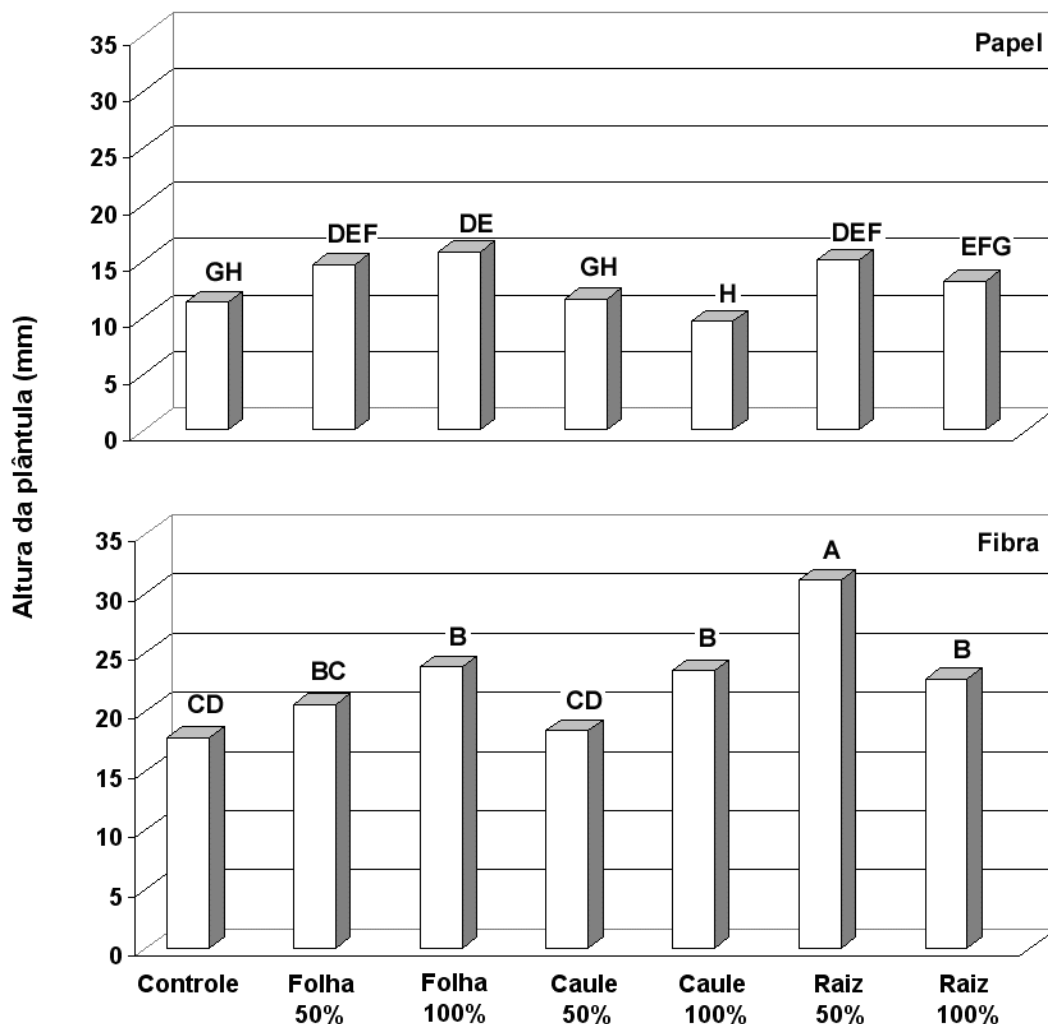


Figura 34 - Valores médios da altura de plântulas normais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Ocotea odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Quando se utilizou papel de filtro umedecido com os extratos de *O. odorifera*, verificou-se que os extratos de folha nas duas concentrações (50 e 100%) e o extrato de raiz na concentração de 50% causaram estímulo no crescimento da altura das plântulas. Os valores de altura das plântulas crescidas em meio contendo os demais extratos não diferiram estatisticamente do controle (Figuras 30 e 34).

Quando se analisaram os valores de comprimento da raiz das plântulas de alface, observou-se que aquelas crescidas na fibra de coco umedecida com os extratos de folha na concentração de 50%, caule nas duas concentrações e de raiz na concentração de 100% apresentaram um estímulo do crescimento das raízes quando comparadas com o grupo controle (Figuras 30 e 35). Para as plântulas crescidas em papel de filtro, todos os extratos, com exceção do de caule na concentração de 50%, causaram inibição no crescimento do sistema radicular das plântulas quando comparadas com o controle.

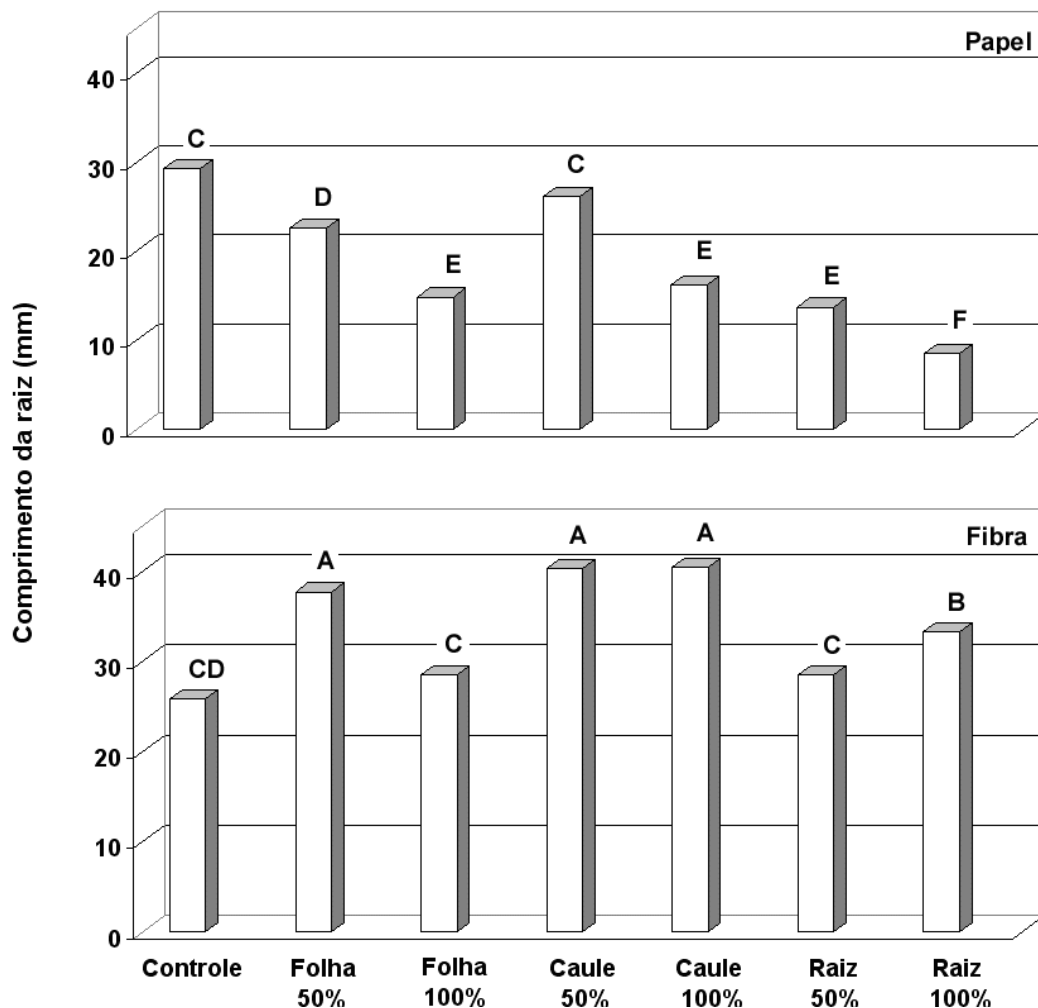


Figura 35 - Valores médios de comprimento radicular de plântulas normais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Ocotea odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Borges *et al.* (1993) utilizando extratos aquosos de folhas de *O. odorifera* (porém com metodologia diferente, ou seja, fervendo o extrato), não observaram diferenças no comprimento da radícula de plântulas de alface quando comparadas com o seu controle. No entanto, quando estes mesmos autores fizeram extratos etanólicos (também aquecidos) verificaram que o comprimento da radícula de plântulas de alface foi significativamente menor que as do grupo controle.

Para os valores de massa seca total das plântulas de alface crescidas no substrato de fibra de coco, contendo os extratos de *O. odorifera*, observou-se que os extratos de caule e raiz, ambos na concentração de 50% proporcionaram os maiores valores de massa seca total, quando comparados com o controle. O mesmo aconteceu para as plântulas crescidas no papel de filtro umedecido com os extratos de folha na concentração de 50% e caule na concentração de 50 e 100% (Fig. 36).

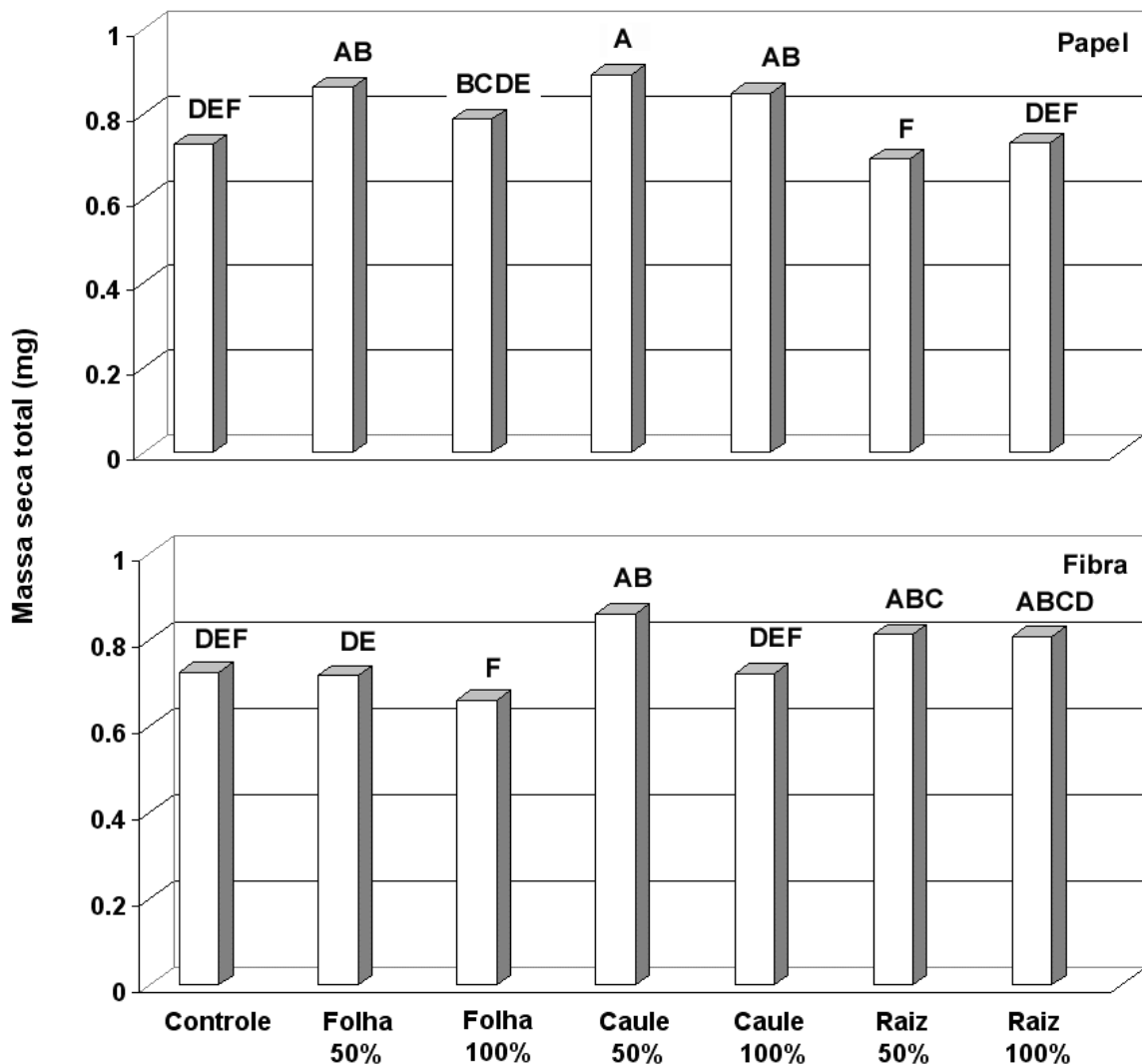


Figura 36 - Valores médios de massa seca total de plântulas normais de alface (*Lactuca sativa*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Ocotea odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

A Figura 37 apresenta os valores de altura das plântulas de rabanete quando crescidas nos dois substratos sob a influência dos extratos de folha, caule e raiz de *O. odorifera* e em água. Nas plântulas crescidas na fibra de coco observa-se que os extratos de caule nas concentrações de 50 e 100% e o de raiz, na concentração de 100%, causaram aumento na altura das plântulas. Os demais extratos não causaram diferenças significativas deste parâmetro, quando comparadas com o controle.

Nas plântulas crescidas no papel de filtro observa-se que os extratos de caule na concentração de 50% e de raiz, nas duas concentrações, causaram diminuição na altura das plântulas, enquanto que o extrato de folha na concentração de 100% aumentou a altura das plântulas de rabanete (Figuras 33 e 37).

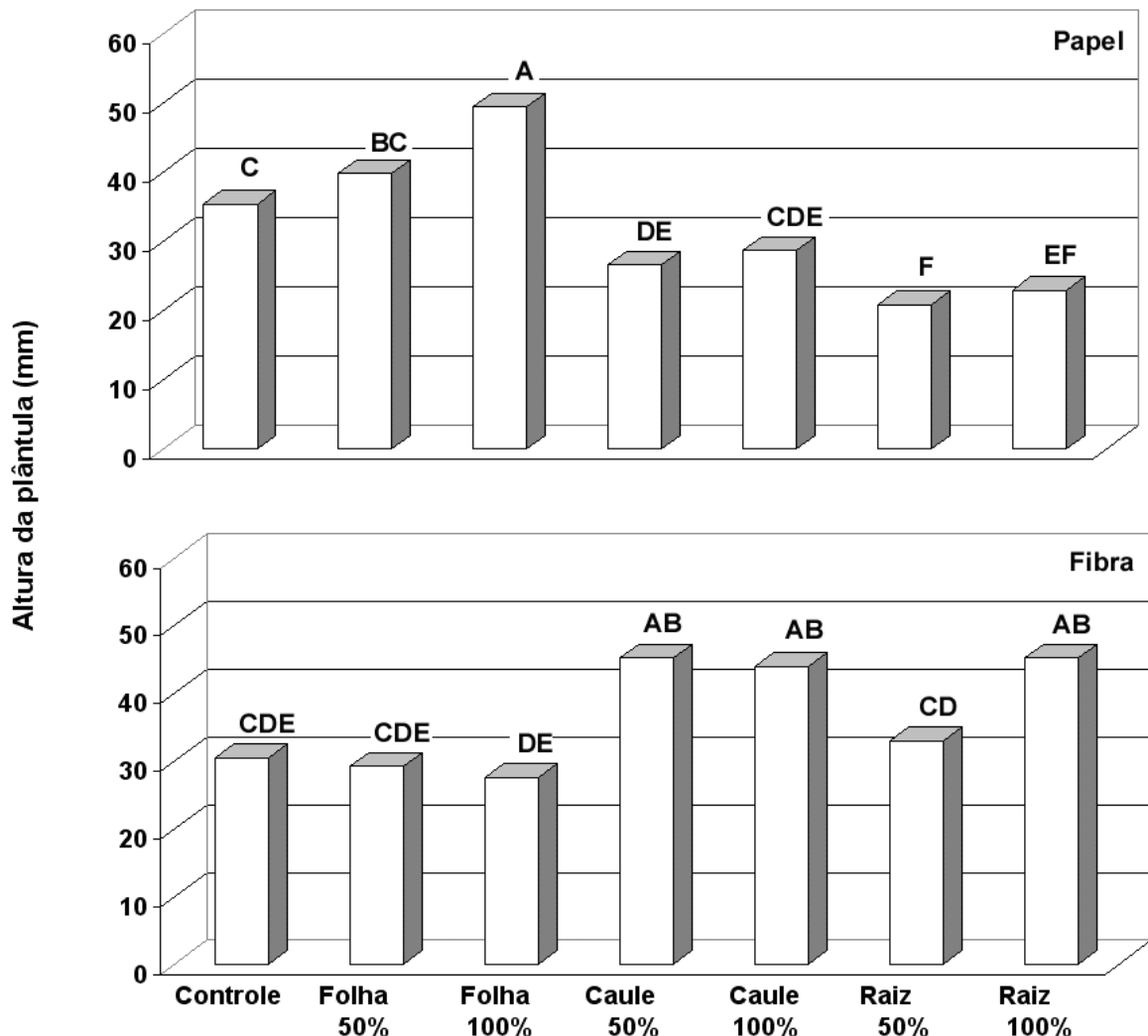


Figura 37 - Valores médios da altura das plântulas normais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Ocotea odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Com relação ao comprimento radicular das plântulas de rabanete observa-se que aquelas crescidas na fibra de coco sob influência dos extratos de caule nas duas concentrações e de raiz na concentração de 100%, obtiveram valores estatisticamente maiores que o controle (Figuras 32 e 38). Para as plântulas crescidas no substrato de papel de filtro nota-se que todos os valores são significativamente menores que do controle, e esta inibição é mais evidente quando as plântulas foram crescidas em meio contendo os extratos de raiz de *O. odorifera* (Figuras 33 e 38).

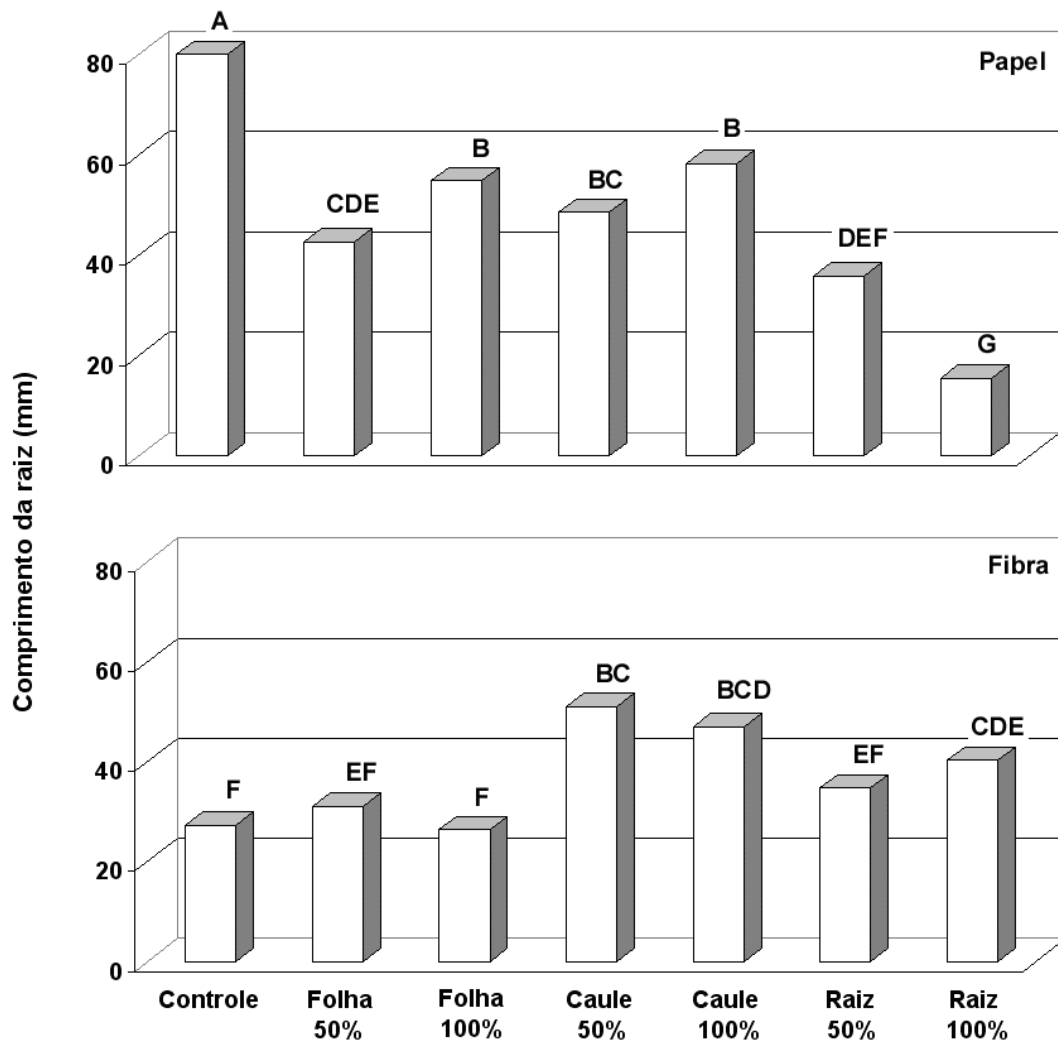


Figura 38 - Valores médios de comprimento radicular de plântulas normais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidos com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *Ocotea odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Quanto ao parâmetro massa seca total, não se observa diferença significativa entre os valores, para as plântulas crescidas em fibra de coco em todos os extratos e suas concentrações. Para as plântulas crescidas no papel de filtro, o único valor que diferiu estatisticamente do controle foi o de caule, na concentração de 50% (Figura 39).

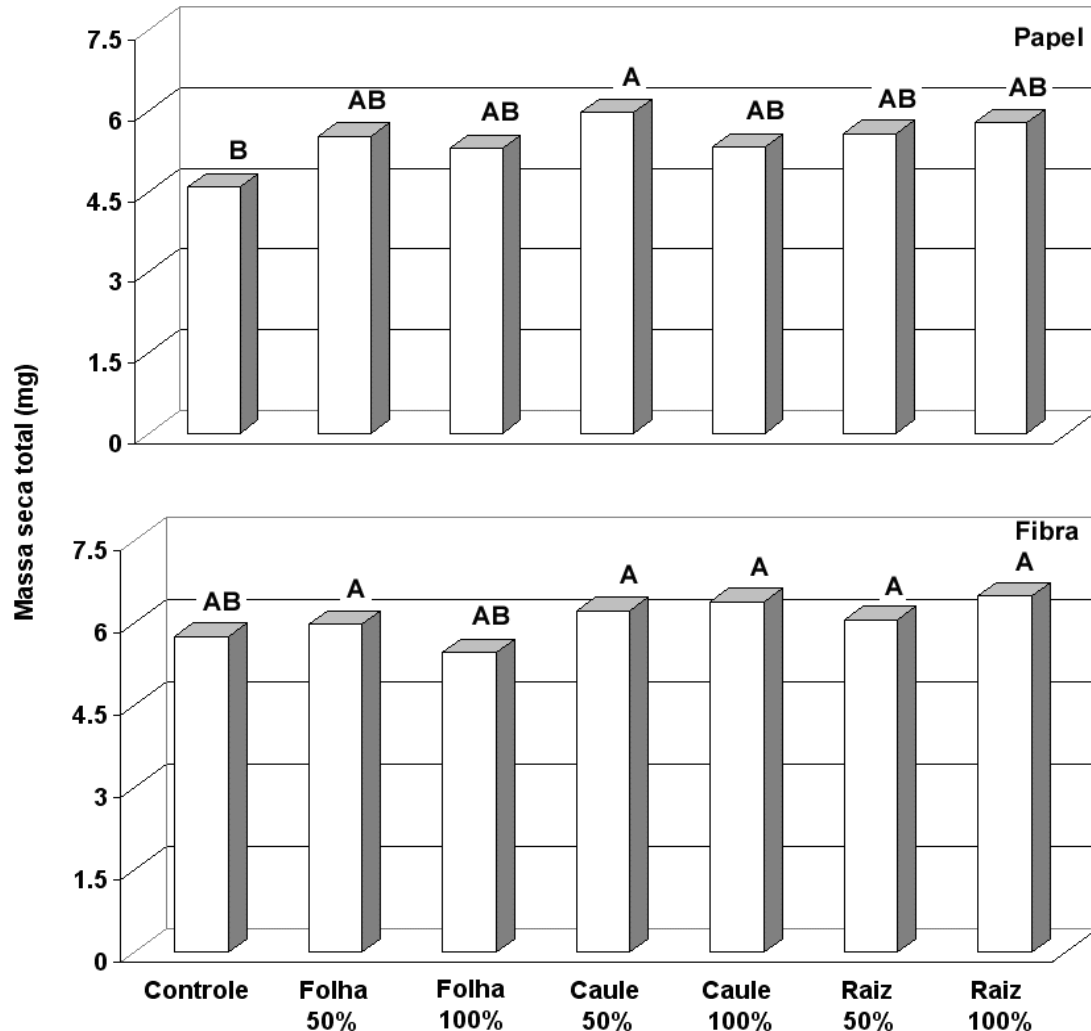


Figura 39 - Valores médios de massa seca total de plântulas normais de rabanete (*Raphanus sativus*) crescidas em papel de filtro e fibra de coco, umedecidas com diferentes extratos (folha, caule e raiz) de *O. odorifera*, em duas concentrações (50 e 100%, mais o controle - 0%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, quando comparados conjuntamente os dois substratos.

Diante dos resultados de crescimento para as plântulas de alface e rabanete sob influência dos extratos de *O. odorifera*, nota-se que não houve inibição do crescimento das plântulas quando crescidas no substrato de fibra de coco e analisadas sob todos os parâmetros. Pode ter havido adsorção pelas micelas do substrato, inibindo a ação de supressão de possíveis aleloquímicos, uma vez que,

segundo Pires e Oliveira (2001), a textura e a aeração do solo interferem na atividade dos compostos químicos.

Com relação ao parâmetro de comprimento da raiz para as duas plântulas (alface e rabanete), observa-se que houve inibição somente quando as plântulas foram crescidas no papel de filtro. Verificou-se estímulo do crescimento radicular quando foram crescidas no substrato fibra de coco. O extrato que mais diminuiu o comprimento das raízes foi o de raiz e o que mais estimulou foi o de caule.

De maneira geral, as plântulas de alface e rabanete, tiveram seu desenvolvimento alterado, ora inibido ora estimulado, dependendo principalmente do tipo de substrato em que foram crescidas, tendo em vista que o processo de inibição só aconteceu quando as plântulas foram crescidas no papel de filtro. Possivelmente, este fato pode ser explicado, pelas características físicas da fibra de coco, uma vez que este substrato pode ter retido o aleloquímico, enquanto que no papel de filtro, a raiz da plântula tem uma área maior de contato com o aleloquímico.

Borges *et al.* (1993) também obtiveram resultados diferentes variando o tipo de substrato utilizado (areia e terra) usando folhas picadas de várias espécies incluindo a *O. odorifera*. Eles sugerem que esta diferença seja devida à lixiviação destas folhas para o fundo do recipiente, quando utilizaram substrato de areia.

Características Físico-Químicas dos Extratos

a) pH

Os extratos provenientes de *O. odorifera* apresentaram valores de pH entre 4.77 e 5.72.

As folhas, caule e raiz de *O. odorifera* obtiveram valores de pH 5.22, 5.72 e 4.77, respectivamente, caracterizando-os assim com baixa acidez. Borges *et al.* (1993) obtiveram respostas estatisticamente iguais para extratos aquosos de folhas de *O. odorifera* com pH variando entre 4.3 e 7.0, comprovando que neste caso, o pH com valores acima de 4.3 não interferiram no crescimento das plântulas de alface.

Santos *et al.* (2002) obtiveram valores de pH variando entre 5.48 e 6.41 para extratos de cascas de café e de arroz, utilizados para determinar a influência destes extratos na emergência e crescimento de *Amaranthus viridis*.

b) Experimento com PEG

Quando colocadas para germinar em soluções de PEG-6000, as sementes de alface e rabanete responderam diferentemente uma da outra. Depois de três dias em que as sementes foram colocadas para germinar, observou-se que todas as sementes de rabanete germinaram em todos os potenciais osmóticos. No entanto, 100% das sementes de alface germinaram apenas nos potenciais de 0 (controle) e -0.2 MPa. Na solução de -0.3 e -0.4 MPa germinaram 33 e 20% das sementes. Este resultado se manteve até o 7^o dia após a montagem do experimento.

c) Potencial osmótico

Os valores de potencial osmótico dos extratos de folha, caule e raiz foram de 90, 67 e 44 mOsm/Kg, o que em corresponde a -0.22, -0.16 e -0.10 MPa, respectivamente. Sendo assim variaram entre 44 e 90 mOsmol/Kg, o que corresponde a -0.10 e -0.22 MPa.

Considerando que soluções com potenciais osmóticos próximos de -0.2 MPa não interferem significativamente na germinação das sementes de alface e rabanete, pode-se inferir que a redução na velocidade e porcentagem de germinação destas sementes (Figuras 28 e 29) tenha acontecido principalmente pela presença de atividade alelopática nestes extratos.

Nos bioensaios de crescimento, as respostas obtidas para os parâmetros estudados (parte aérea, comprimento radicular e massa seca) podem ser resultantes da interação de alguns fatores adicionais à atividade alelopática, como por exemplo a os potenciais osmóticos dos extratos, além das características físicas e químicas dos substratos, que podem interagir com os extratos.

Conclusões

Diante dos resultados de germinação das sementes de alface e rabanete, quando germinadas em meio contendo os extratos de *Ocotea odorifera*, percebe-se que:

- O extrato que proporcionou maior redução da porcentagem de germinação para as sementes de alface e rabanete foi o de folha.
- Os extratos provenientes dos três órgãos (folha, caule e raiz) causaram atraso na germinação das sementes de alface.
- Percebe-se uma dependência apenas da concentração dos extratos, (independente do órgão testado), quando sementes de rabanete foram germinadas.
- O processo de inibição (diante de todos os extratos) só aconteceu quando as plântulas foram crescidas no substrato de papel de filtro.
- Não houve inibição do crescimento das plântulas quando crescidas no substrato de fibra de coco e analisadas sob todos os parâmetros.
- O comprimento das raízes só diminuiu quando as plântulas cresceram no papel de filtro, e o extrato de raiz foi o que causou o maior efeito inibitório.
- Houve estímulo no crescimento radicular em plantas crescidas na fibra de coco, e o extrato de caule foi o maior responsável.
- O substrato interferiu significativamente nos resultados obtidos.
- Além da atividade alelopática, em alguns casos, pode ter ocorrido interferência adicional devido às características físico-químicas (pH e potencial osmótico) dos extratos e dos substratos.

Desta forma pode-se concluir que a espécie *O. odorifera* apresentou atividade alelopática na germinação das sementes e crescimento das plântulas de alface e rabanete.

Referências

- ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (Circular IAPAR, 53).
- AQUILA, M.E.A. Efeito alelopático de *Ilex paraquariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, n. 53, p. 51-66, ago., 2000.
- BACKES, P.; IRGANG B. **Árvores do sul: guia de identificação & interesse ecológico**. Vila Flores: Impressora Pallotti, 2002. 316 p.
- BASE DE DADOS TROPICAL. **Lista da flora ameaçada de extinção no Brasil**. [Disponível em: < <http://www.bdt.org.br>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2000.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento da plantas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.
- BORGES, E.E.L.; LOPES, E.S.; SILVVA, G.F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I: árvores. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 17, n. 1, p. 69-84, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- DURIGAN, J.C. ; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: FUNEP, 28 p. 1993.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição Especial.
- GORLA, C.M. ; PEREZ, S.C.J.G.A. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 261-266, 1997.
- GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. **Perfun Essential Oil Record**, p. 18-21, Jan., 1960.

- HARBORNE, J.B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A. (Ed.). **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. New York: Oxford Science Publications, 1991. p. 399-426.
- HARBORNE, J.B. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M.J. (Ed.). **Plant Ecology**. 2. ed. Blackwell Science, 1997 p.132-155.
- HICKEY, M.J. Investigation of the chemical constituents of brazilian sassafrás oil. **Contribution from the research laboratory of fritzsche brothers**, p. 443-446, 1948.
- JUAN JIMÉNEZ-OSORNIO, F.M.V.Z.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides*. L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, p.195-205, 1996.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: OEA, 1983. 173 p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Editora RiMa, 2000. 531 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.
- MOLLAN, MT.R.M. The essential oils of the sassafras laurels. I - *Ocotea pretiosa*, Brazilian sassafras, safrole type. **Perfun Essential Oil Record**, June, 1961a.
- MOLLAN, MT.R.M. The essential oils of the sassafras laurels. II - The safrole - Camphor type of sassafras laurel. **Perfun Essential Oil Record**, June, 1961b.
- PARANHOS, M.V.; NAGEM, T.J.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, T.T.; QUEIROZ, M.E.L.R. Estudos alelopáticos dos constituintes químicos isolados das raízes de *Himatanthus phagedaenicus* (MART.) WOODSON. **Revista da Pesquisa & Pós-graduação**, ano 1, v. 1, n. 2, p. 5-9, jul/dez. 1999.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 130-136, jan/dez., 2001.

- PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, 2001, p. 145-185.
- PUTNAM, A.R. ; TANG, C.S. Allelopathy: state of the science. In: _____. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 1-19
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 26, p. 13-23, 1998.
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 26, p. 13-23, 1998.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984. 353 p.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ- UNESP/FUNEP, 1992. 18 p. (Boletim).
- SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F.; MENDES, A.N.G; MORAIS, A.R.; CONCEIÇÃO; H.E.O.; MARINHO, J.T.S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 783-790, jun., 2002.
- VACCARINI, C.E.; PALACIOS, S.M.; MERAGELMAN, K.M.; SOSA, V.E. Phytogrowth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 227-230, 1999.
- VILES, R.N.; REESE, R.N. Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36. n. 1, p. 39-43, 1996.
- VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, nov/dez., 1991.
- YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1031-1032, 1995.

- YAMADA, K.; ANAI, T.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationship of lepidimoide and its analogues. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 671-673, 1996.
- YOKOTANI-TOMITA, K.; GOTO, N.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. Growth-promoting allelopathic substance exuded from germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-2, 1998.

Conclusão Geral

A partir dos resultados obtidos no teste preliminar, pode-se concluir que:

- Os extratos aquosos das folhas das espécies *Anemopargna arvensis*, *Aristolochia esperanzae*, *Bacharis dracunculifolia*, *Casearia sylvestris*, *Drymis brasiliensis*, *Memora peregrina*, *Ocotea odorifera*, *Palicourea rígida*, *Peritassa campestris* apresentaram atividade alelopática na germinação das sementes de alface e rabanete.
- Dentre os extratos que mais diminuíram e atrasaram a germinação de alface e rabanete, encontram-se os de *B. dracunculifolia*, *A. esperanzae*, *D. brasiliensis*, *M. peregrina*, *O. odorifera*.

Diante da metodologia aplicada e dos resultados obtidos utilizando extratos de *Aristolochia esperanzae* pode-se inferir que:

- Os extratos aquosos de folha foram os que provocaram maior inibição da germinação das sementes de alface e rabanete.
- Todos os extratos e concentrações retardaram a germinação de sementes de alface e rabanete.
- Os extratos de caule e raiz causaram anormalidade nas plântulas de alface e rabanete, e em alguns casos, na concentração de 100%, também provocaram mortalidade.
- A utilização da fibra de coco foi mais adequada que o papel de filtro na avaliação do crescimento inicial das plântulas de alface e rabanete, devido às suas características físicas, proporcionando uma melhor sustentação das plântulas.
- O uso de papel de filtro umedecido com os diferentes extratos causou maior efeito inibitório no crescimento das plântulas, se comparado com a fibra de coco.
- Entre os extratos de maior concentração (100%), o de folha foi o que menos inibiu o crescimento das plântulas, e na maioria dos casos o de raiz foi o que mais inibiu.
- A concentração dos extratos foi a principal responsável pelo estímulo ou inibição causada no crescimento das plântulas de alface e rabanete.

- Além da atividade alelopática, em alguns casos, pode ter ocorrido interferência adicional devido às características físico-químicas (pH e potencial osmótico) dos extratos e dos substratos.
- A partir dos resultados obtidos nas análises químicas pode-se indicar a presença de taninos e triterpenos como responsáveis pela atividade alelopática desta espécie.

Diante dos resultados obtidos quando as sementes de alface e rabanete foram germinadas e crescidas em meio contendo os extratos de *Ocotea odorifera*, pode-se concluir:

- O extrato que proporcionou maior redução da porcentagem de germinação para as sementes de alface e rabanete foi o de folha.
- Os extratos provenientes dos três órgãos (folha, caule e raiz) causaram atraso na germinação das sementes de alface.
- Percebe-se uma dependência apenas da concentração dos extratos, (independente do órgão testado), quando sementes de rabanete foram germinadas.
- O processo de inibição (diante de todos os extratos) só aconteceu quando as plântulas foram crescidas no substrato de papel de filtro.
- Não houve inibição do crescimento das plântulas quando crescidas no substrato de fibra de coco e analisadas sob todos os parâmetros.
- O comprimento das raízes só diminuiu quando as plântulas cresceram no papel de filtro, e o extrato de raiz foi o que causou o maior efeito inibitório.
- Houve estímulo no crescimento radicular em plantas crescidas na fibra de coco, e o extrato de caule foi o maior responsável.
- O substrato interferiu significativamente nos resultados obtidos.
- Além da atividade alelopática, em alguns casos, pode ter ocorrido interferência adicional devido às características físico-químicas (pH e potencial osmótico) dos extratos e dos substratos.

Desta forma pode-se inferir que as espécies *Aristolochia esperanzae* e *Ocotea odorifera* apresentaram atividade alelopática na germinação de sementes e no crescimento das plântulas de alface (*Lactuca sativa*) e rabanete (*Raphanus sativus*)

Apêndice

A Figura I ilustra o funcionamento dos tipos de cromatografias quando se trata de um sólido, como sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto na interfase entre o sólido e a fase móvel.

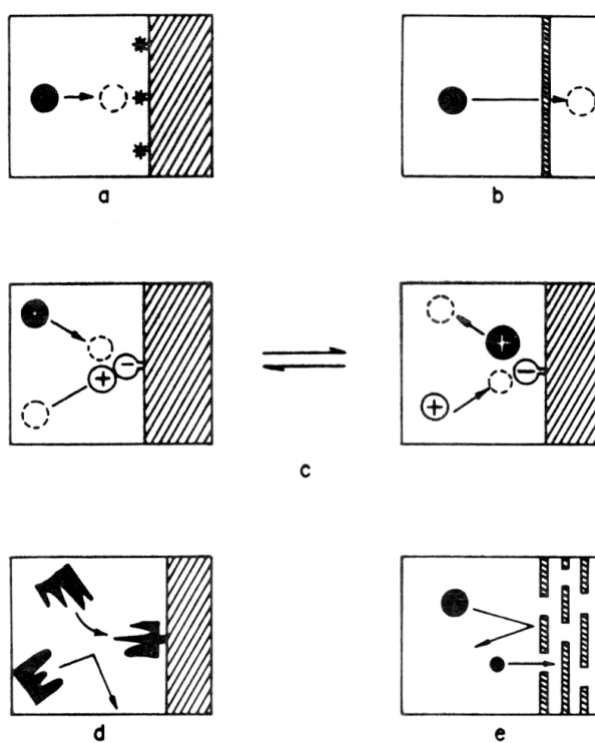


Figura I - Esquema dos mecanismos cromatográficos de a: absorção; b: partição; c: troca iônica; d: bioafinidade; e: exclusão. (Fonte: Collins, *et al.*, 1990).

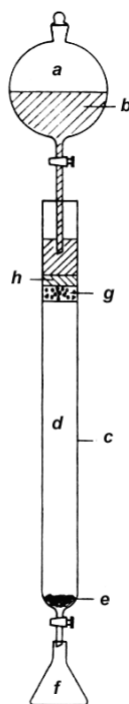


Figura II - Esquema de uma coluna de adsorção. a: reservatório; b; fase móvel; c: coluna de vidro; e: chumacho de algodão; f: frasco coletor; g: amostra; h: camada de areia ou de recheio, colocada após a aplicação da amostra. (Fonte: Collins, *et al.*, 1990).

O esquema de uma coluna de vidro, utilizada na cromatografia por adsorção, pode ser observada na Figura II. A Tabela I apresenta uma série de solventes, que podem ser utilizados como eluentes em processos cromatográficos, em ordem crescente de polaridade.

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

Série de eluentes, em ordem crescente de polaridade *

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

* de ponto de ebulição baixo

A Figura III apresenta uma representação gráfica de como acontece o processo de eluição de três compostos em uma mistura, na cromatografia por adsorção.

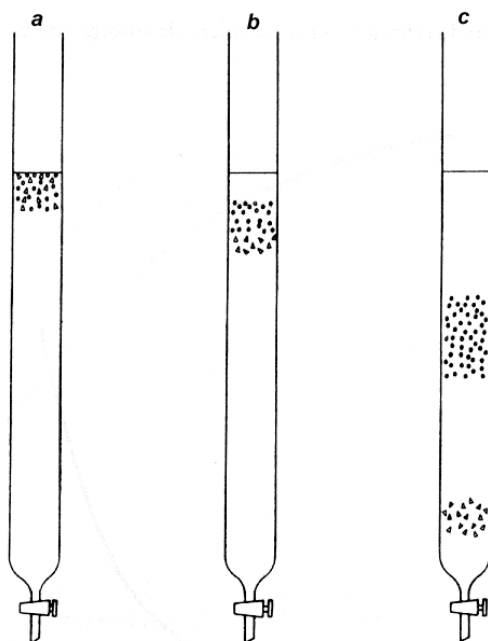


Figura III - Eluição de três compostos em uma mistura na cromatografia por adsorção. a: mistura no topo da coluna; b: início da separação; c: separação completa de um dos componentes. (Fonte: Collins, *et al.*, 1990).

A Figura IV apresenta uma representação gráfica de como acontece o processo de eluição de compostos em uma mistura na cromatografia por exclusão.

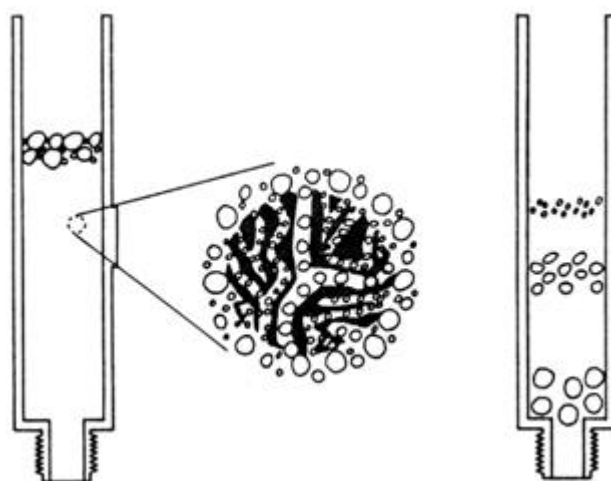


Figura IV - Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão. (Fonte: Collins, *et al.*, 1990).

Aristolochia esperanzae O. Kuntze ocorre no centro-nordeste de São Paulo, oeste de Minas Gerais, sul de Goiás, oeste de Mato Grosso do Sul, nordeste, centro e sul do Paraguai, nordeste da Argentina e sul da Bolívia (Capellari, 1991) (Figura V).

Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer ocorre desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, na floresta fluvial atlântica, podendo ser encontrada também nos campos de altitude da Serra da Mantiqueira em São Paulo e Minas Gerais e, nas matas de pinhais do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. (Lorenzi, 2002) (Figura V).

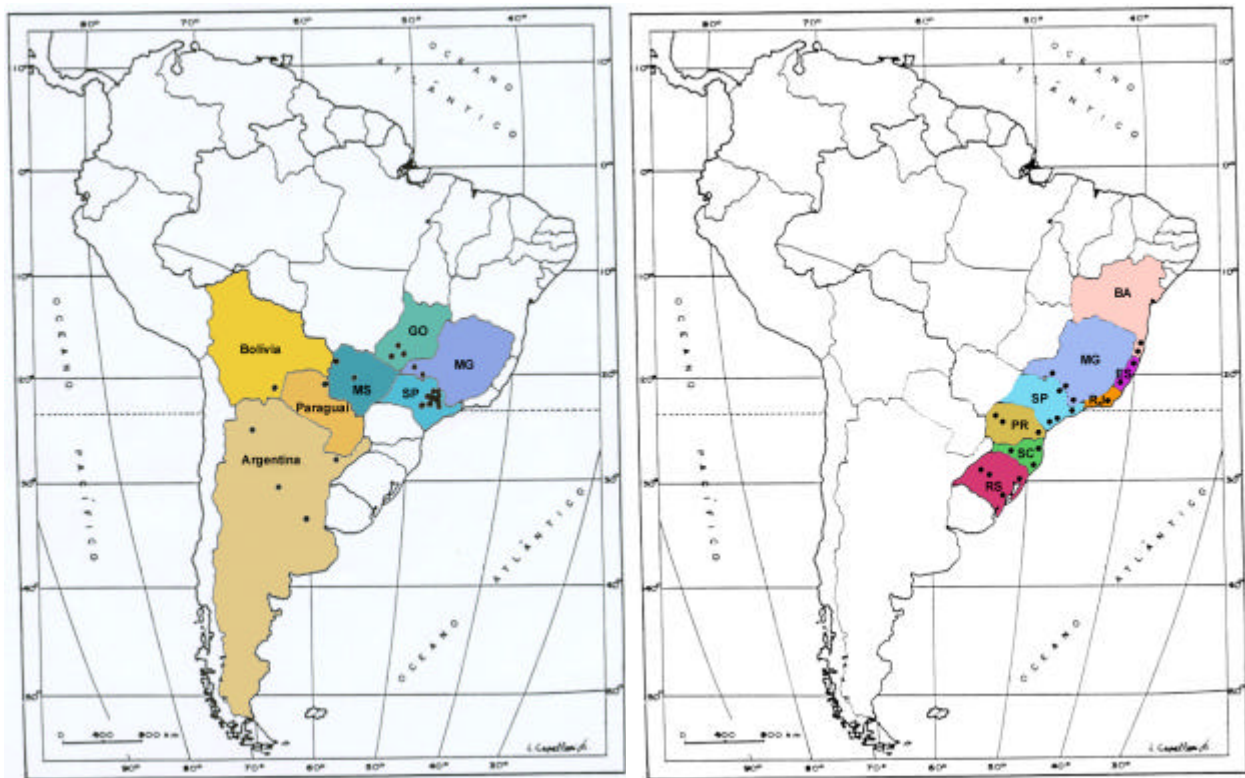


Figura V – Mapas de distribuição geográfica de *Aristolochia esperanzae* (esquerda) (modificado de Capellari, 1991) e *Ocotea odorifera* (direita) (modificado de Capellari, 1991, segundo Lorenzi, 2002).

CAPELLARI, L.J. **Espécies de *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo.** Campinas, Universidade de Campinas, 1991. (Dissertação de Mestrado).

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.

Glossário

Absorção - Fixação de uma substância, geralmente líquida ou gasosa, no interior da massa de outra substância, em geral sólida, e resultante dum conjunto complexo de fenômenos de capilaridade, atrações eletrostáticas, reações químicas, etc.

Adsorvente - Substância que adsorve.

Adsorver - Fixação de moléculas de uma substância (o adsorvato) na superfície de outra substância (o adsorvente).

Adsorvato - substância que é adsorvida.

Dessorção - Processo inverso da adsorção ou da absorção.

Eluição - 1. Dessorção provocada por um fluxo de líquido ou de gás através de um adsorvente. 2. É a separação sequencial ou concomitante de uma ou várias substâncias pela passagem de fase móvel adequada, que é o eluente.

Hidrófilo - 1. Ávido de água. - 2. Que a absorve bem.

Osmolalidade - Concentração de partículas osmoticamente ativas em solução, e expressa em termos de osmoles de soluto por quilo de solvente.

Osmolaridade - Concentração de partículas osmoticamente ativas em solução, e expressa em termos de osmoles de solutos por litro de solução.

Polar - 1. Quím. Diz-se de substância que possui grande constante dielétrica (substância ou objeto isolador da eletricidade). 2. Quím. Diz-se de ligação covalente formada entre dois átomos de eletronegatividades muito diferentes, ou de grupos que contenham tais ligações.

pH - Potencial hidrogeniônico - Logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio numa solução; pH. [As soluções ácidas têm pH menor que 7; as básicas, maior que 7; e as neutras, em torno de 7.]

Sorção - Fenômeno simultâneo de adsorção e absorção.

Software - Programa em inglês.