

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

ESTUDO ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE DO CERRADO

Maristela Imatomi

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

São Carlos, SP
2010

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

I31ea

Imatomi, Maristela.

Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado / Maristela Imatomi. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 88 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Alelopatia. 2. Fitotoxinas. 3. Crescimento de plântulas. 4. Germinação. 5. Herbicida. 6. Fracionamento. I. Título.

CDD: 581.23 (20^a)

Maristela Imatomi

**ESTUDO ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE DO
CERRADO**

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

Aprovada em 20 de dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Presidente Sonia Cristina Juliano Gualtieri
Prof. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri
(Orientadora)

1º Examinador Maria Inês Salgueiro Lima
Prof. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima
PPGERN/UFSCar

2º Examinador Eliana Akie Simabukuro
Prof. Dra. Eliana Akie Simabukuro
PPGDBC/UFSCar

3º Examinador Andréia Pereira de Matos
Prof. A. Dra. Andréia Pereira de Matos
UNICEP/São Carlos-SP

4º Examinador João Paulo de Souza
Prof. Dr. João Paulo de Souza
UFV/Florestal-MG

Orientadora: Prof^{ta} Dr^a Sonia Cristina Juliano Gualtieri

Doutoranda: Maristela Imatomi

Depois de uma longa espera consegui, finalmente, plantar o meu jardim. Tive de esperar muito tempo porque jardins precisam de terra para existir. Mas a terra eu não tinha. De meu, eu só tinha o sonho. Sei que é nos sonhos que os jardins existem, antes de existirem do lado de fora. Um jardim é um sonho que virou realidade, revelação de nossa verdade interior escondida, a alma nua se oferecendo ao deleite dos outros, sem vergonha alguma... Mas os sonhos, sendo coisas belas, são coisas fracas. Sozinhos, eles nada podem fazer: pássaros sem asas... São como as canções, que nada são até que alguém as cante; como as sementes, dentro dos pacotinhos, à espera de alguém que as liberte e as plante na terra. Os sonhos viviam dentro de mim. Eram posse minha. Mas a terra não me pertencia.

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, especialmente:

À Prof^a Sonia Cristina J. Gualtieri pela orientação, por ter me dado a oportunidade de realizar este doutorado e principalmente pela amizade, atenção, compreensão e alegria.

À Prof^a Maria Inês Salgueiro Lima pelas valiosas “dicas” que me ajudaram muito a direcionar este trabalho e pela amizade e carinho de sempre.

Não poderia deixar de citar o Prof^o Alfredo Gui Ferreira, que mesmo não contribuindo diretamente para a realização deste trabalho, me ensinou muito enquanto co-orientador do mestrado.

Ao Grupo de alelopatia da Universidade de Cádiz, Espanha: Aos Professores Francisco Antonio Macías, Jose Maria Gonzalez e Rosa Maria Montoya Varela pela orientação e carinho, ao Blas del Valle pela ajuda nos experimentos e pela alegria e, ao Andy e Rodney pela diversão cubana no laboratório. Às brasileiras Mariluce Nepomuceno pelo carinho materno, à Silmara C. Fanti e Sonia C. J. Gualtieri pela amizade, à Sarah C Caldas pelo acolhimento e enorme ajuda e à Paula Novaes, minha companheira de sempre.

Aos membros da banca de qualificação Eliana Akie Simabukuro, Maria Inês Salgueiro Lima e Silmara Cristina Fanti pelas valiosas sugestões e correções oferecidas.

Aos amigos João Paulo de Souza, Paula Novaes e Fabiana Aud pelas valiosas sugestões, pela amizade, companheirismo e carinho sempre.

Aos meus pais, Keiychi e Shisako, e minhas irmãs Milena e Melissa pelo apoio e carinho.

Ao meu “namorado” Marcos Barbosa Silva pelo auxílio, carinho, leituras, sugestões e principalmente pela paciência sempre!

Aos amigos pelo carinho e pelas conversas, pela amizade tão sincera e atenção sempre. Por todos os momentos de descontração, de cumplicidade, aprendizado, risadas e convivência, principalmente à companheira de sempre Melissa Ottoboni Segura.

Ao Departamento de Botânica e Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realizar este doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais e da Secretaria Geral de Recursos Humanos da UFSCar. Principalmente ao técnico Carlos Aparecido Casali e ao Marco Bertini.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os vegetais liberam metabólitos primários e secundários no ambiente que podem influenciar no desenvolvimento da vegetação adjacente, este fenômeno de interferência é denominado alelopatia. É reconhecida como um processo ecológico importante, pois interfere na estrutura, distribuição, composição e dinâmica de comunidades vegetais. Estudos sobre interações alelopáticas podem ser úteis na busca por fitotoxinas naturais, produzidas por plantas ou microrganismos a serem empregados como herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente. De acordo com inventário florístico realizado pelo IBGE a família Myrtaceae é uma das principais em riqueza e diversidade no ecossistema de cerrado. Assim, este trabalho tentou esclarecer as seguintes questões: espécies da família Myrtaceae presentes no cerrado apresentam potencial alelopático? Existe semelhança na resposta alelopática dentro dos gêneros? Dentre as espécies ativas, qual a mais promissora para se iniciar uma bioprospecção? Alguma dessas espécies apresenta potencial para utilização como herbicida em sistemas agroflorestais ou de produção orgânica de alimentos? Para responder essas perguntas foram realizados bioensaios de germinação de diásporos e crescimento de plântulas, de espécies alvo cultivadas e infestantes de cultura, e extração química de compostos ativos em folhas de *Myrcia tomentosa*. As folhas maduras de *Blepharocalyx salicifolius*, *Campomanesia pubescens*, *Eugenia bimarginata*, *Eugenia klotzschiana*, *Eugenia myrcianthes*, *Eugenia puniceifolia*, *Myrcia bella*, *Myrcia lingua*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens*, *Myrcia tomentosa*, *Psidium australe*, *Psidium cinereum*, *Psidium laruotteanum* e *Psidium rufum* foram coletadas, higienizadas, trituradas e armazenadas em embalagens plásticas até a utilização. Na primeira etapa, os bioensaios de germinação e crescimento, foram efetuados utilizando-se extratos aquosos de pó de folhas em concentração de 10% (p/v). Como espécies receptoras foram selecionadas duas eudicotiledôneas *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum* e, uma monocotiledônea *Allium cepa*, nas quais foram aplicados os extratos de todas as espécies de Myrtaceae comparadas ao controle (água destilada). Na segunda etapa, os bioensaios foram efetuados utilizando-se extratos aquosos de pó de folhas em concentração de 5 e 10% (p/v). Como espécies receptoras foram selecionadas as infestantes de cultura *Euphorbia heterophylla*, *Echinochloa crus-galli* e *Ipomoea grandifolia*, nas quais foram aplicados os extratos de folhas de *B. salicifolius*, *M. multiflora*, *M. splendens* e *M. tomentosa*, comparadas ao controle negativo (água destilada) e ao positivo (herbicida Oxifluorfem). Na terceira etapa, foram efetuados biotestes de germinação, crescimento e de coleóptilo de trigo para direcionar a extração química de compostos ativos de *M. tomentosa*. Para tanto as extrações foram feitas empregando-se o pó de folhas e os solventes orgânicos de diferentes polaridades. Os extratos foram fracionados em coluna cromatográfica e purificados em CLAE. Os compostos isolados e purificados foram identificados em RMN¹³C e RMN¹H, por comparação de espectros. Os resultados mostraram que extratos aquosos de doze das quinze espécies doadoras avaliadas apresentaram atividade alelopática e cada espécie demonstrou comportamento distinto em relação à atividade alelopática, não houve agrupamento por proximidade taxonômica. Avaliando as quatro espécies mais ativas sobre espécies invasoras, constatou-se o potencial e a eficiência dos extratos, uma vez que estes foram mais fitotóxicos às espécies invasoras que o herbicida. O extrato foliar de *M. tomentosa* destacou-se por demonstrar elevada atividade mesmo em baixa concentração, assim foi realizada a extração química do pó de folhas desta espécie. Foram isolados dois compostos do extrato acetato de etila: juglanina e avicularina, o que as diferencia é a hidroxila ligada ao carbono 3' na molécula de avicularina, esta diferença produziu efeito fitotóxico mais acentuado da molécula de

juglanina. O presente trabalho relatou pela primeira vez a presença dos flavonóides kaempferol (juglanina) e quercetina (avicularina) em uma espécie de Myrtaceae do cerrado e deu embasamento para futuros estudos relativos à bioprospecção da espécie *Myrcia tomentosa*, da qual não se encontrou nenhum relato de estudos alelopáticos, fracionamento e identificação de compostos químicos.

Palavras-chave: alelopatia, crescimento, germinação, fitotoxinas, herbicida, similaridade entre gêneros, extrato foliar aquoso, fracionamento químico, flavonóides.

ABSTRACT

The plants release primary and secondary metabolites in the environment that may influence the development of adjacent vegetation, this interference phenomenon is called allelopathy. It is recognized as an important ecological process because it interferes with the structure, distribution, composition and dynamics of plant communities. Studies on allelopathic interactions may be useful in the search for natural phytotoxins are produced by plants or microorganisms to be used as natural herbicides, more specific and less harmful to the environment. According to floristic survey conducted by IBGE, Myrtaceae family is one of the major in the cerrado ecosystem. This study attempted to clarify the following issues: species of Myrtaceae family present in the cerrado (Brazilian savanna) exhibit allelopathic potential? There is a similar allelopathic response within genera? Among the active species, which is most promising for starting a bioprospecting? Some of these species has potential as a herbicide for use in agroforestry or organic production of food? To answer these questions were conducted experiments of seed germination and seedling growth of target species cultivated and weedy, and chemical extraction of active compounds in leaves of *Myrcia tomentosa*. The leaves of *Blepharocalyx salicifolius*, *Campomanesia pubescens*, *Eugenia bimarginata*, *Eugenia klotzschiana*, *Eugenia myrcianthes*, *Eugenia puniceifolia*, *Myrcia bella*, *Myrcia lingua*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens*, *Myrcia tomentosa*, *Psidium australe*, *Psidium cinereum*, *Psidium laruotteanum* and *Psidium rufum* were collected, cleaned, crushed and stored in plastic bags until use. In the first stage, were carried out the germination and growth bioassays using aqueous extracts of leaf in a concentration of 10% (w / v). We selected three target species, *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum*, both eudicotyledonous and a monocotyledonous *Allium cepa*. The extracts were applied to all Myrtaceae species compared with the control (distilled water). In the second phase, bioassays were carried out using aqueous extracts of leaves at concentrations of 5 and 10% (w / v). We selected as target species three weeds *Euphorbia heterophylla*, *Echinochloa crus-galli* and *Ipomoea grandifolia*. The leaf extracts of *B. salicifolius*, *M. multiflora*, *M. splendens* and *M. tomentosa* were compared to negative control (distilled water) and positive (herbicide Oxyfluorfen). In the third stage were carried out biotests germination, growth, and coleoptile of wheat (*Triticum aestivum*) to direct chemical extraction of active compounds of *M. tomentosa*. The extractions were carried out using dried leaves powdered and organic solvents of different polarity, the extracts were fractionated using chromatographic column and purified by HPLC. The isolated and purified compounds were identified in RMN¹³C and RMN¹H, by comparison of spectra. The results showed that aqueous extracts of twelve out of fifteen donor species evaluated showed allelopathic activity and each species showed a distinct behavior regarding the allelopathic activity, no grouping by taxonomic proximity. Evaluating the four species most active on weeds species, was detected the potential and efficiency of the extracts, since these were more toxic to weeds species than the herbicide. The leaf extracts of *M. tomentosa* stood out for demonstrating high activity even at low concentrations, so was chemical extraction from powdered of leaves of *M. tomentosa* were isolated two compounds from the ethyl acetate extract: juglanin and avicularin, the difference between

both is the presence of one hydroxyl attached to carbon 3' in avicularin molecule, this difference has an phytotoxic effect more pronounced in the juglanin. This paper is the first report of the presence of the flavonoids kaempferol (juglanin) and quercetin (avicularin) in species of Myrtaceae of cerrado (Brazilian savanna) and gave foundation for future studies on bioprospecting of the *M. tomentosa*, which did not find any reports of allelopathic studies, fractionation and identification of chemical compounds.

Keywords: allelopathy, growth, germination, phytotoxins, herbicide, genera similarity, leaf aqueous extracts, chemical fractionation, flavonoids.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Valores médios de porcentagem de germinação (■), tempo médio (▲), entropia informacional de germinação (○) e índice de resposta alelopática (*RI*, □), de diásporos de alface, cebola, e tomate submetidas aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e controle (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*) significativamente diferente do controle.....21
- Figura 1.2.** Valores médios do comprimento da parte aérea (□) e raiz (■) de plântulas de diásporos de alface, cebola, e tomate submetidas aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e controle (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$). (*) Diferem significativamente do controle.....23
- Figura 1.3.** Dendrograma da Similaridade de Bray-Curtis para as variáveis de germinação e crescimento de alface, cebola e tomate entre as espécies doadoras avaliadas (Coeficiente de correlação: 0,85; min y:0,59).26
- Figura 2.1.** Valores médios de porcentagem de germinação, tempo médio, entropia informacional e índice de resposta a efeitos alelopáticos (*RI*) da germinação de diásporos de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola submetidas aos extratos aquosos, nas concentrações de 5 e 10%, de folhas das espécies doadoras, herbicida Oxifluorfem (controle positivo) e água destilada controle (controle negativo) (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*) significativamente diferente do controle.....45
- Figura 2.2.** Valores médios da inibição/estímulo, em relação ao controle, do comprimento da parte aérea e raiz de plântulas dos diásporos de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola submetidos aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e ao herbicida Oxifluorfem nas concentrações de 5 e 10% (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*)Diferem significativamente do controle....47

Figura 2.3. Anomalias observadas nas plântulas de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola. a) controle; b) necrose da raiz; c) inversão gravitrópica; d) plântulas atrofiadas.....	49
Figura 2.4. Porcentagem acumulada de anomalias proporcionadas pelos extratos aquosos de folhas de Myrtaceae e pelo herbicida, ambas nas concentrações de 5 e 10%, nas plântulas de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola.....	51
Figura 3.1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados com o pó das folhas secas de <i>Myrcia tomentosa</i>	65
Figura 3.2. Rendimento (%) dos extratos obtidos a partir de 1,5Kg do pó de folhas secas de <i>Myrcia tomentosa</i> na extração com solventes orgânicos: hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (ACE), metanol (MeOH) e água. (*) Extrato selecionado para fracionamento em coluna cromatográfica.....	69
Figura 3.3. Porcentagem de inibição/estímulo, em relação ao controle, do comprimento (mm) de coleótilos de trigo crescidos durante 24 h a 25°C no escuro, em diferentes extratos obtidos a partir do pó de folhas secas de <i>Myrcia tomentosa</i> extraídas com hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (Acet), metanol (MeOH) e, pelo herbicida (Herb). (*) Diferença significativa em relação ao controle.....	70
Figura 3.4. Porcentagem de inibição/estímulo do comprimento das plântulas, em relação ao controle, proporcionado pelos extratos obtidos a partir do pó de folhas secas de <i>Myrcia tomentosa</i> , extraídas com diferentes solventes orgânicos, sobre a germinação de diásporos e comprimento da parte aérea e raiz de plântulas de alface, agrião, cebola e tomate mantidas em câmara de germinação a 25 °C no escuro. Hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (Acet), metanol (MeOH) e pelo herbicida (Herb). (*) Indica diferença significativa em relação ao controle.....	72

- Figura 3.5.** Rendimento (%) das frações resultantes do fracionamento em coluna cromatográfica de sílica a partir de 18 g do extrato de acetato de etila adquirido a partir do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*. (*) Frações selecionadas para fracionamento em coluna cromatográfica.....74
- Figura 3.6.** Porcentagem de inibição/estímulo, em relação ao controle, das frações F8 e F9, resultantes do fracionamento em coluna cromatográfica de sílica, sobre o crescimento do coleóptilo de trigo de 2mm crescidos durante 24 horas a 25°C no escuro (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$). (*) Diferem significativamente do controle.....75
- Figura 3.7.** Rendimento (%) das subfrações resultantes do segundo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica a partir das frações F8 (m = 159,7 mg) e F9 (m = 284,6 mg) obtidas do primeiro fracionamento realizado a partir do extrato acetato de etila de pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*.. (*) Subfrações selecionadas para fracionamento em CLAE.....76
- Figura 3.8.** Estrutura química dos principais tipos de flavonóides (Março et al. 2008)....78
- Figura 3.9.** Estrutura molecular dos flavonóides glicosilados isolados e identificados em folhas de *Myrcia tomentosa*.....80

- Tabela 1.1.** Ordem decrescente da frequência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras. Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de alface (A), cebola (C) e tomate (T) para a porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*), entropia informacional (*I*) e comprimentos da parte aérea e raiz das plântulas.....24
- Tabela 2.1.** Ordem crescente da frequência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras. Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de amendoim bravo (A), capim arroz (B) e corda de viola (C) para a porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*), entropia informacional (*I*) e comprimentos da parte aérea e raiz das plântulas.....54
- Tabela 3.1.** Produtos obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir das subfrações purificadas do extrato acetato de etila do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*.....77

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS_____	v
RESUMO_____	vi
ABSTRACT_____	viii
ÍNDICE DE FIGURAS_____	x
ÍNDICE DE TABELAS_____	xiii
INTRODUÇÃO GERAL_____	03
Referências Bibliográficas_____	08

CAPÍTULO 1 VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Introdução_____	14
Material e Métodos_____	16
Resultados_____	20
Discussão_____	26
Referências Bibliográficas_____	30

CAPÍTULO 2
EXTRATOS DE FOLHAS DE MYRTACEAE APRESENTAM POTENCIAL
PARA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE DE PLANTAS INVASORAS?

Introdução _____	37
Material e Métodos _____	39
Resultados e Discussão _____	42
Referências Bibliográficas _____	54

CAPÍTULO 3
ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS ATIVOS DE FOLHAS DE *Myrcia*
tomentosa (MYRTACEAE)

Introdução _____	62
Material e Métodos _____	63
Resultados e Discussão _____	68
Referências Bibliográficas _____	82
CONCLUSÕES GERAIS _____	86
Anexo I _____	87
Anexo II _____	88

INTRODUÇÃO GERAL

O sedentarismo das comunidades vegetais é compensado, evolutivamente, com mecanismos de defesa, divididos em: estruturais, fenológicos e químicos. Os estruturais incluem adaptações morfológicas, como presença de espinhos, tricomas, folhas coriáceas, entre outros. A defesa fenológica está relacionada à adequação do ciclo biológico dos vegetais, visando evitar condições de estresse. A defesa química, constitutiva ou induzida, é representada pela produção de compostos de origem secundária em resposta ao estresse causado à planta, como a herbivoria, afídeos ou patógenos (Oliveiros-Bastidas 2008).

No cerrado as plantas crescem em solos pobres (Haridasan 2000), conseqüentemente a reposição de folhas predadas representa um custo elevado para os vegetais presentes na comunidade (Fine et al. 2006) e a competição por nutrientes é intensa. Deste modo, as espécies desse ecossistema apresentam mecanismos de defesa como: produção de folhas em períodos propícios, folhas coriáceas, baixos níveis de nitrogênio e água, e quantidades elevadas de compostos fenólicos (Marquis et al 2002).

A predação e a competição por recursos restringem a distribuição dos vegetais. Elas agem como um filtro ambiental e selecionam espécies com características que levam a sobrevivência de populações submetidas às pressões ambientais (Fukami et al. 2005). Características funcionais são geralmente conservadas filogeneticamente em linhagens de plantas (Ackerly 2003). Assim, a proximidade filogenética entre as espécies e as características herdadas do ancestral comum revela respostas similares aos processos ambientais (Webb et al. 2002; Núñez-Farfán et al. 2007; Silva e Batalha 2010). Contudo, plantas com proximidade filogenética e submetidas às mesmas condições ambientais, tendem a apresentar características semelhantes, principalmente em relação aos mecanismos de defesa, no qual se inclui a produção de compostos químicos secundários. No primeiro capítulo deste trabalho, serão comparados cinco gêneros de Myrtaceae, presentes no cerrado, na tentativa de verificar a existência de atividade alelopática dessas plantas e a similaridade dessa atividade com a proximidade filogenética.

A alelopatia refere-se à interação entre plantas e outros organismos mediada por produtos químicos, que são lançados no ambiente pelas plantas doadoras, por lixiviação, exsudação da raiz, volatilização, e decomposição de resíduos vegetais. Estes aleloquímicos podem ter efeito benéfico ou prejudicial sobre as plantas receptoras tanto em sistemas naturais quanto agrícolas (Kobayashi 2004; Lara-Núñez et al. 2009). A Interação

aleloquímica é um importante mecanismo de interferência que influencia nos padrões de estrutura e composição da vegetação, crescimento de plantas invasoras e produtividade de culturas (Dakshini et al. 1999; Weir et al. 2004). Esta interação é complexa e envolve diversas classes de compostos químicos que têm diferentes alvos no organismo receptor (Lara-Nuñez et al. 2009).

Os aleloquímicos afetam diferentes processos metabólicos nos organismos, incluindo alterações na permeabilidade da membrana (Bogatek et al. 2005), absorção de íons (Gniazdowska e Bogatek 2005), inibição do transporte de elétrons na respiração e na fotossíntese (Abrahim et al. 2000), alterações de atividades enzimáticas (Singh et al. 2009) e inibição da divisão celular (Teerarak et al. 2010).

O primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de plantas vizinhas foi descrito por Theophrastus (300 a.C.), Virgílio (70-19 a.C.) e Plínio “O velho” (23-79 a.C.), os quais descreveram a existência de “interações maléficas” entre os vegetais, nos primeiros tratados sobre agricultura (Willis 2007). Apenas no século XX a alelopatia adquiriu caráter científico, com trabalhos que demonstravam as interações alelopáticas, porém eram relatos descritivos e sem rigor experimental. Os estudos mais recentes tem discutido caminhos para reforçar a qualidade das pesquisas em alelopatia, englobando aspectos fisiológicos, químicos e ecológicos, o campo da alelopatia tem se aperfeiçoado nos últimos anos, publicando trabalhos inovadores e metodologicamente rigorosos (Blair et al. 2009).

Durante o século XX as pesquisas sobre produtos naturais ganharam um grande impulso em resposta ao desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e espectroscópicas (Macías et al. 2007). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) permitiu o isolamento e purificação dos compostos em pequenas quantidades e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), juntamente com a espectrometria de massa (EM) e infravermelho (IV), tem permitido a elucidação estrutural de muitos aleloquímicos conhecidos atualmente (Macías et al. 2008).

A alelopatia se tornou uma importante ferramenta para identificar plantas que apresentam compostos bioativos (Oliveros-Bastidas 2008) a partir dos quais podem ser produzidos herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente (Macías et al. 1998). Além disso, a alelopatia tem recebido crescente atenção na aplicação em sistemas orgânicos de manejo, no qual não é permitida a aplicação de produtos sintéticos e em sistemas agroflorestais (Olofsdotter et al. 2002; Weston e Duke 2003; Jose et al. 2004;

Belz 2008). Outro fator que torna os estudos alelopáticos essenciais é o aparecimento de espécies de plantas infestantes de cultura mais resistentes aos herbicidas, exigindo alternativas ao controle químico convencional (Oliveros-Bastidas 2008; Bertholdsson 2010). No campo da ecologia, a alelopátia tem recebido particular atenção na invasão biológica, explicando o sucesso de algumas plantas invasoras e de plantas exóticas introduzidas (Blair et al. 2005; Cappuccino e Arnason 2006; Dorning e Cipollini 2006; Ridenour et al. 2008; Thorpe et al. 2009).

Produtos naturais que apresentam atividade biológica são as principais fontes de novas estruturas químicas úteis ao desenvolvimento de moléculas com potencial para utilização na farmacologia, agronomia e outros campos do conhecimento humano. Um crescente interesse tem sido focado nos metabólitos secundários das plantas, os quais desempenham importante função na comunicação química entre organismos (Macías et al. 2008).

O interesse por esses metabólitos secundários surgiu devido a sua composição química promissora. Taiz e Zeiger (2009) classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Rice (1984) propôs um agrupamento dos compostos químicos que possuem atividade alelopática 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.

Os herbicidas são a classe de defensivos com maior demanda pela agricultura brasileira. Em 2008, o consumo dessa classe ultrapassou os 59% do total geral, registrando demanda aproximada de 186 mil toneladas de ingrediente ativo (Bortoletto et al. 2010). Segundo dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em 2010, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo pelo segundo ano consecutivo. Levantamentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (Sindag) no ano de 2009, mostram crescimento de 44,6% do consumo de agrotóxicos no Brasil no período de 2004 a 2008 (Carneiro e Almeida 2010). A utilização em larga escala de agrotóxicos tem trazido uma série de problemas ambientais, com impactos significativos na biota e riscos ao homem (Peres e Moreira 2007). A solução para o país está na conversão do modelo agroquímico para um modelo de base agroecológica (Carneiro e Almeida 2010).

A demanda por produtos orgânicos vem aumentando nos últimos anos em resposta aos danos provocados à saúde humana pelo uso de herbicidas (Copping e Duke 2007). Na maioria dos países, o sistema orgânico de produção agrícola não permite o uso de herbicidas sintéticos, assim o manejo de plantas invasoras é problemático (Dayan et al. 2009), dessa maneira é necessário o desenvolvimento de produtos naturais com atividade herbicida que supram esse mercado emergente.

Segundo Copping e Duke (2007) existem poucos herbicidas naturais sendo comercializados atualmente, esses autores citam alguns exemplos como os Bilanafos, Ácido acético, Ácidos graxos, Ácido pelargônico, glúten de milho, 2-Phenethyl propinato, Azadirachtin /dihydroazadirachtin e Óleo de cravo. Embora já existam herbicidas naturais comerciais, ainda há poucos estudos que comparam a eficácia de herbicidas naturais com sintéticos (Copping e Duke 2007). No segundo capítulo do presente estudo, os efeitos alelopáticos dos extratos aquosos de folhas de mirtáceas foram comparados com os do herbicida sintético Oxifluorfem, dessa maneira foi verificado o potencial de aplicação das espécies estudadas no controle de plantas invasoras de culturas.

O conhecimento das potencialidades alelopáticas é essencial para o sucesso dos sistemas agrofloretais (uso de associações de espécies arbóreas com a agricultura). Rizvi et al. (1999) enfatiza a importância de sistemas agrofloretais para o uso sustentável da terra e o aumento da produtividade agrícola, listando aproximadamente 80 espécies consideradas agrofloretais com potencialidades alelopáticas, espécies com potencial contra patógenos de culturas e insetos, além de aleloquímicos já isolados que são utilizados como herbicidas.

Pouco tem sido feito para compreender as implicações de aleloquímicos em sistemas agrofloretais, embora seja um importante fator na determinação do sucesso das árvores e das culturas agrícolas nestes ambientes, uma vez que uma pode interferir sobre o desenvolvimento da outra. No entanto, informações sobre a natureza das substâncias químicas das espécies utilizadas em sistemas agrofloretais podem fornecer subsídios para o seu manejo adequado. Dessa maneira, a implantação de culturas consorciadas com espécies arbóreas adequadas, ou seja, das quais já existam informações da natureza química, pode proporcionar aumento da produtividade agrícola por meio do controle de plantas invasoras, nematóides, patógenos e insetos (Kohli et al. 1998; Rizvi et al. 1999).

Os compostos naturais possuem vantagens sobre os compostos sintéticos, como ausência de moléculas halogenadas e menor meia vida (Duke et al. 2000; Rimando e Duke

2006). A necessidade de produzir herbicidas menos impactantes ao ambiente tem aumentado a busca por compostos naturais mais específicos em seu modo de ação e por produtos de degradação mais toleráveis pelos organismos que compõe a biota (Oliveros-Bastidas 2008).

A família Myrtaceae possui cerca de 3.100 espécies em aproximadamente 140 gêneros, separados em duas subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae (segundo APG II modificado por Judd et al. 1999; Watson e Dallwitz 2007). A família Myrtaceae destaca-se como uma das famílias mais abundantes e diversificadas nos ecossistemas brasileiros (Mori et al. 1983), onde ocorrem 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies da subfamília Myrtoideae (Cardoso e Sajo 2006). O inventário da flora brasileira efetuado pelo IBGE indica que o cerrado apresenta aproximadamente 14 gêneros e 211 espécies, sendo considerada uma das famílias mais representativas do ecossistema. Apesar da importância dessa família, poucos são os estudos referentes ao seu potencial alelopático. Assim, surgiram duas perguntas: Espécies da família Myrtaceae, presentes no cerrado apresentam atividade alelopática? E qual das espécies estudadas é a mais promissora para se iniciar uma bioprospecção?

Para responder a estas perguntas, o presente estudo foi realizado em três etapas:

No primeiro capítulo, foram testadas as hipóteses: as Myrtaceae presentes no cerrado apresentam potencial alelopático e, as espécies dentro de cada gênero apresentam respostas alelopáticas semelhantes. Para testar estas hipóteses foram investigadas as atividades alelopáticas de 15 espécies (5 gêneros) de Myrtaceae presentes no cerrado sobre três espécies alvo bioindicadoras.

No segundo capítulo, foi testada a hipótese: extratos aquosos de folhas de Myrtaceae apresentam potencial para inibir o desenvolvimento de plantas infestantes de culturas. Para testar esta hipótese foram avaliadas as atividades alelopáticas de folhas das quatro espécies de Myrtaceae, selecionadas a partir dos resultados da primeira etapa. Foram avaliados extratos aquosos de folhas sobre a germinação e morfologia das três plantas infestantes mais frequentes em sistemas agrícolas e comparados com o herbicida oxifluorfem comumente utilizado no controle dessas espécies.

No terceiro capítulo, foi testada a hipótese: As folhas de *Myrcia tomentosa* apresentam fitotoxinas promissoras na busca por compostos bioativos. Para testar esta hipótese foi efetuado estudo biodirigido para isolamento e identificação desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham D, Braquini WL, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL (2000) Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. **Journal of Chemical Ecology** 26:611-624
- Ackerly DD (2003) Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. **International Journal of Plant Science** 164: 165–184
- Belz RG (2008) Stimulation versus inhibition – Bioactivity of parthenin, A phytochemical from *Parthenium hysterophorus* L. **Dose-Response** 6: 80-96.
- Bertholdsson N-O (2010) Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. **Weed Research** 50: 49-57.
- Blair AM, Hanson BD, Brunk GR, Marrs RA, Westra P, Nissen SJ, Hufbauer RA (2005) New techniques and findings in the study of a candidate allelochemical implicated in invasion success. **Ecology Letters** 8: 1039-1047
- Blair AC, Weston LA, Nissen SJ, Brunk GR, Hufbauer RA (2009) The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions** 11: 325-332.
- Bogatek R, Oracz K, Gniazdowska A (2005) Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Fourth World Congress on Allelopathy. http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409_bogatekr.htm (Acessado em 22/06/2010)
- Bortoletto FS, Trombeta NC, Neves EM (2010) Uso de herbicidas no Brasil: Taxa de crescimento e demanda relativa no decênio 1999-2008. <http://www.usp.br/siicusp/Resumos/17Siicusp/resumos/2456.pdf> (Acessado em 27/10/2010)
- Cappuccino N, Arnason JT (2006) Novel chemistry of invasive exotic plants. **Biology Letters** 2: 189–193.
- Cardoso CMV, Sajo MG (2006) Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Botânica Brasílica** 20(3):657-669.
- Carneiro FF e Almeida VES (2010). UNB <http://www.unb.br/noticias/unbagencia/artigo.php?id=279#> (acessado em 03/11/2010)
- Copping LG, Duke SO (2007) Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science** 63: 524-554
- Dakshini KMM, Foy CL, Inderjit (1999) Allelopathy: one component in a multifaceted approach to Ecology. In: Inderjit, Dakshini KMM, Foy CL (eds) **Principles and Procedures in Plant Ecology: Allelochemical Interactions**. CRC Press, New York, 3–14 pp.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009) Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17: 4022-4034

- Dorning M, Cipollini D (2006) Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology** 184: 287-296
- Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM (2000) Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research** 40: 99-111
- Fine PVA, Miller ZJ, Mesones I, Irazuzta S, Appel HM, Stevens MHH, Sääksjärvi I, Schultz JC, Coley PD (2006) The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. **Ecology** 87:150–162
- Fukami T, Bezemer TM, Mortimer SR, van der Putten WH (2005) Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly. **Ecology Letters** 8:1283–1290
- Gniazdowska A, Bogatek R (2005) Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum** 27(3B):395-407. doi: 10.1007/s11738-005-0017-3
- Haridasan M (2000) Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 54–64
- Jose S, Gillespie AR, Pallardy SG (2004) Interspecific interactions in temperate agroforestry. **Agroforestry Systems** 61: 237-255
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland
- Kobayashi K (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management** 4: 1–7.
- Kohli RK, Bstish D, Singh HP (1998) Allelopathy and its implications in agroecosystems. **Journal of Crop Production** 1: 169-202
- Lara-Núñez A, Sánchez-Nieto S, Anaya AL, Cruz-Ortega R (2009) Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. **Physiologia Plantarum** 136: 180-192
- Macías, FA, Varela RM, Torres A, Oliva RM, Molinillo JMG (1998) Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. **Phytochemistry** 48(4): 631-636.
- Macías FA, Molinillo JMG, Varela RM, Galindo JCG (2007) Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science** 63: 327-348
- Macías FA, Oliveiros-Bastidas A, Marín D, Carrera C, Chinchilla N, Molinillo JMG (2008) Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potencial use as herbicides models. **Phytochemistry Reviews** 7: 179-194
- Marquis RJ, Morais HC, Diniz IR (2002) Interactions among cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds.) **The cerrados of Brazil**. Columbia University Press, New York, 306-328 pp.

- Mori SA; Boom BM, Carvalino AM, Santos TS (1983) Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica** 1:68-70.
- Núñez-Farfán J, Fornoni J, Valverde PL (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 38:541-566.
- Oliveros-Bastidas AJ (2008) El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva** 7(1): 1-34
- Olofsson M, Jensen LB, Courtois B (2002) Improving crop competitive ability using allelopathy – an example from rice. **Plant Breeding** 121 (1): 1–9
- Peres, F, Moreira, JC (2007) Saúde e Ambiente e Sua Relação Com o Consumo de Agrotóxicos em um Pólo Agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro.
- Rice EL (1984) **Allelopathy**. Academic Press, New York
- Ridenour WM, Vivanco JM, Feng Y, Horiuchi J, Callaway RM (2008) No evidence for tradeoffs: *Centaurea* plants from America are better competitors and defenders than plants from the native range. **Ecological Monographs** 78: 369–386
- Rimando AM, Duke SO (2006) Natural Products for Pest Management. In: Rimando A, et al. **Natural Products for Pest Management**; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC
- Rizvi SJH, Tahir M, Rizvi V, Kohli RK, Ansari A (1999) Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Science** 18 (6): 773-796
- Silva DM, Batalha MA (2010) Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology** doi: 10.1007/s11258-010-9813-y
- Singh A, Singh D, Singh NB (2009) Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation** 58:163–171.
- Taiz L, Zeiger E (2009) **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre
- Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P (2010) Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology** 101:5677–5684.
- Thorpe AS, Thelen GC, Diaconu A, Callaway RM (2009) Root exudates is allelopathic in invaded community but not in native community: field evidence for the novel weapons hypothesis. **Journal of Ecology** 97: 641-645
- Watson L, Dallwitz MJ (2007) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://delta-intkey.com>. Accessed 28 June 2010.
- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ (2002) Phylogenies and community ecology. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 33:475–505.

Weir T, Park S-W, Vivianco JM (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology** 7:472-479

Weston L, Duke SO (2003) Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** 22: 367–389

Willis R (2007) **The Historiy of Allelopathy**. The Netherlands: Springer.

CAPÍTULO 1

VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Resumo Alelopatia é o processo de interferência, no qual espécies vegetais liberam metabólitos no ambiente que podem influenciar no desenvolvimento de plantas adjacentes. É reconhecida como um processo ecológico importante, interferindo na estrutura, distribuição, composição e dinâmica de comunidades vegetais. A vegetação de cerrado apresenta aproximadamente 14 gêneros e 211 espécies pertencentes a família Myrtaceae, sendo considerada uma das famílias mais representativas deste ecossistema. Apesar da importância dessa família, poucos são os estudos referentes ao potencial alelopático dessas plantas. Assim, as hipóteses testadas foram: 1) espécies de plantas da família Myrtaceae presentes no cerrado apresentam potencial alelopático; 2) espécies dentro do mesmo gênero apresentam respostas alelopáticas semelhantes. Para testar essas hipóteses, foram investigadas as atividades alelopáticas de 15 espécies (cinco gêneros) de Myrtaceae presentes no cerrado no estado de São Paulo, Brasil. Para isso, foi avaliada a germinação e morfologia das espécies bioindicadoras (cebola, alface e tomate) submetidas ao extrato aquoso de folhas de Myrtaceae. Estes extratos foram avaliados em bioensaios de germinação e crescimento. Os resultados mostraram que extratos aquosos de doze das quinze espécies doadoras avaliadas apresentaram atividade alelopática. Cada espécie demonstrou comportamento distinto em relação à atividade alelopática, não houve agrupamento por proximidade taxonômica.

Palavras-chave alelopatia, crescimento, extratos foliares aquosos, germinação, similaridade entre gêneros.

Abstract Allelopathy is a interference process whereby plant species release metabolites into the environment, influencing the development of adjacent plants. It is recognized as an important ecological process because it affects the structure, distribution, composition and dynamics of plant communities. The cerrado (savannah) vegetation has approximately 14 genera and 211 species belonging to the Myrtaceae family, which is considered one of the most representative families in this ecosystem. There are few studies on the allelopathic potential of these plants despite the importance of this family. Thus, we addressed two specifically questions: 1) plant species of the Myrtaceae family present in the cerrado show allelopathic potential, and 2) species within the same genera have similar allelopathic responses. To answer these, we investigated the allelopathic activities of 15 species (five genera) of Myrtaceae present in the cerrado in São Paulo state, Brazil. We evaluated the germination and morphology of bioindicator plants (lettuce, onion and tomato) submitted to the leaf Myrtaceae aqueous extracts. This extracts were evaluated in germination and growth bioassay. The results showed that twelve aqueous extracts out of fifteen evaluated donor species showed allelopathic activity. Each species showed different behavior in relation to allelopathic activity, there was no grouping by taxonomic proximity.

Keywords Allelopathy, Growth, Germination, Genera similarity, Leaf aqueous extracts.

Introdução

Os vegetais liberam metabólitos primários e secundários no ambiente que podem influenciar no desenvolvimento da vegetação adjacente, este fenômeno de interferência é denominado alelopatia (Rice 1984; Inderjit e Duke 2003). As rotas de liberação destes aleloquímicos para o ambiente podem ocorrer por meio da volatilização da parte aérea da planta, lixiviação das superfícies do vegetal e serrapilheira, liberação de exsudados pelas raízes e da decomposição de resíduos vegetais (Rice 1984; Ahmed et al. 2008; Zhang et al. 2010).

Os aleloquímicos afetam diferentes processos metabólicos nos organismos, incluindo alterações na permeabilidade da membrana (Bogatek et al. 2005), absorção de íons (Gniazdowska e Bogatek 2005), inibição do transporte de elétrons na respiração e na fotossíntese (Abrahim et al. 2000), alterações de atividades enzimáticas (Singh et al. 2009) e inibição da divisão celular (Teerarak et al. 2010). Em função dessas alterações, a alelopatia é reconhecida como um processo ecofisiológico importante nos ecossistemas, influenciando na sucessão vegetal primária e secundária, na estrutura, composição e na dinâmica de comunidades vegetais nativas ou cultivadas (Rizvi et al. 1992; 1999; Scrivanti et al. 2003).

As Myrtaceae possuem cerca de 3.100 espécies em aproximadamente 140 gêneros, separados em duas subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae (segundo APG II modificado por Judd et al. 1999; Watson e Dallwitz 2007). No Brasil ocorrem 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies da subfamília Myrtoideae (Cardoso e Sajo 2006). O inventário da flora brasileira efetuado pelo IBGE indica que o cerrado apresenta aproximadamente 14 gêneros e 211 espécies, sendo considerada uma das famílias mais representativas dessa vegetação. Apesar da importância dessa família, poucos são os estudos referentes ao seu potencial alelopático.

Segundo Oliveiros-Bastidas (2008) o sedentarismo das comunidades vegetais é compensado, evolutivamente, com mecanismos de defesa, divididos em: estruturais, fenológicos e químicos. Os estruturais incluem adaptações morfológicas, como presença de espinhos, tricomas, folhas coriáceas, entre outros. A defesa fenológica está relacionada a adequação do ciclo biológico dos vegetais, visando evitar condições de estresse. A defesa química, constitutiva ou induzida, é representada pela produção de compostos de origem

secundária em resposta ao estresse causado à planta, como a herbivoria, afídeos ou patógenos.

No cerrado as plantas crescem em solos pobres (Haridasan 2000), conseqüentemente a reposição de folhas predadas representa um custo elevado para os vegetais presentes na comunidade (Fine et al. 2006) e a competição por nutrientes é intensa. Deste modo, as espécies deste ecossistema apresentam mecanismos de defesa como: produção de folhas em períodos propícios, folhas coriáceas, baixos níveis de nitrogênio e água, e quantidades elevadas de compostos fenólicos (Marquis et al 2002).

A predação e a competição agem como um filtro ambiental, selecionando espécies com características funcionais semelhantes que levam a sobrevivência de populações submetidas às pressões ambientais (Fukami et al. 2005). Características funcionais são geralmente conservadas filogeneticamente em linhagens de plantas (Ackerly 2003). Assim, a proximidade filogenética entre as espécies e as características herdadas do ancestral comum revela respostas similares aos processos ambientais (Webb et al. 2002; Núñez-Farfán et al. 2007; Silva e Batalha 2010). Em adição, plantas com proximidade filogenética e submetidas às mesmas condições ambientais, tendem a apresentar características semelhantes, principalmente em relação aos mecanismos de defesa, no qual se inclui a produção de compostos químicos secundários.

Assim, hipotetizamos que os extratos de folhas dos gêneros da família Myrtaceae apresentam atividade alelopática semelhante, pois, espécies de myrtaceae ocorrentes em cerrado *stricto sensu*, submetidas às mesmas condições ambientais devem apresentar respostas alelopáticas semelhantes, devido à proximidade filogenética e fatores ambientais.

Neste trabalho, foram comparados cinco gêneros de Myrtaceae, presentes no cerrado, na tentativa de verificar a existência de atividade alelopática dessas plantas e a similaridade dessa atividade com a proximidade filogenética. Nós investigamos as atividades alelopáticas de 15 espécies dessa família, presentes no cerrado do estado de São Paulo, Brasil, sobre a germinação e morfologia de plantas bioindicadoras (alface, cebola e tomate).

Material e Métodos

Local de coleta

As coletas de material biológico foram realizadas no cerrado *sensu stricto* do Estado de São Paulo, Brasil. O clima da região, pela classificação de Köppen é do tipo Cwa (tropical de altitude). Existem duas estações climáticas bem definidas, uma chuvosa, normalmente entre os meses de Outubro a Março e um período seco, entre os meses de Abril a Setembro (Monteiro e Prado 2006). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (Ribeiro e Walter 1998).

Material biológico

As espécies de Myrtaceae encontradas na área de estudo foram marcadas e os indivíduos acompanhados até o período de floração e frutificação, o que possibilitou a identificação das espécies. As folhas de cada espécie foram coletadas assistematicamente em pelo menos cinco indivíduos em estágio vegetativo, no período seco (julho a outubro de 2008). As folhas coletadas foram secas em estufa sob 40 °C durante 48 horas, em seguida trituradas em moinho elétrico e armazenadas em embalagens plásticas sob ambiente de laboratório (± 25 °C). Para a confecção dos extratos utilizaram-se folhas das seguintes espécies doadoras: *Blepharocalyx salicifolius* Kuth O. Berg, *Campomanesia pubescens* O. Berg, *Eugenia bimarginata* O. Berg, *Eugenia klotzschiana* O. Berg, *Eugenia myrcianthes* Nied., *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., *Myrcia bella* Cambess., *Myrcia lingua* (O. Berg) Mattos, *Myrcia multiflora* DC., *Myrcia splendens* DC., *Myrcia tomentosa* DC., *Psidium australe* Cambess., *Psidium cinereum* Mart., *Psidium laruotteanum* Cambess. e *Psidium rufum* Mart. Ex DC. As excisas das espécies utilizadas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (HUFSCar) sob os números 8308, 8309, 8310, 8311, 83,12 8313, 8314, 8315, 8316, 8317, 8318, 8319, 8320, 8321, 8322 respectivamente.

O potencial alelopático dos extratos provenientes das folhas das espécies doadoras foi testado nos diásporos de três espécies receptoras. Foram selecionadas duas espécies de eudicotiledôneas *Lactuca sativa* L. var Regina (alface) e *Solanum lycopersicum* L. var IPA 6 (tomate) e uma monocotiledônea *Allium cepa* L. var Baia Periforme (cebola).

Preparação dos extratos foliares

Os extratos foram obtidos a partir da mistura do pó das folhas com água destilada em concentração de 10% (1 g de pó: 10 mL de água). Essa solução, extrato foliar aquoso bruto, permaneceu em repouso durante 12 horas em refrigerador. Decorrido este período, o extrato foi filtrado com auxílio de uma bomba elétrica de vácuo acoplada a um funil de Buckner coberto com papel de filtro qualitativo (Gatti et al. 2004).

Bioensaio de germinação

Os diásporos das espécies alvo foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 5 mL do extrato foliar aquoso bruto das espécies doadoras ou água destilada (controle).

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 20 diásporos por placa de Petri mantidas em câmara de germinação (BOD). As placas de Petri contendo alface e tomate foram mantidas a 25 °C e as placas com cebola foram mantidas a 20 °C, ambas com fotoperíodo de 12 horas, seguindo avaliações prévias realizadas para a determinação das condições adequadas para as espécies alvo.

As contagens foram realizadas em intervalos de 12 horas nos sete primeiros dias, após esse período, os intervalos passavam a ser de 24 horas até totalizar quinze dias após a semeadura ou até que as placas permanecessem três dias sem a ocorrência de germinação. Foram considerados germinados os diásporos com protrusão de uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios (Borghetti e Ferreira 2004).

Bioensaio de crescimento

Os diásporos utilizados neste bioensaio foram previamente germinados em água (2 a 4 mm de radícula), posteriormente foram distribuídos em caixas plásticas transparentes de 500 mL (14 x 10 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 13 mL de extrato foliar aquoso bruto das espécies doadoras ou água destilada (controle) e tampadas. As caixas foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 25 °C para o desenvolvimento da alface e tomate e 20 °C para a cebola, ambas com fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias foram medidos os comprimentos da parte aérea e da raiz primária com um paquímetro digital.

Característica dos extratos

Os potenciais osmóticos dos extratos foram medidos utilizando um osmômetro. As medidas foram obtidas em mOsm.Kg^{-1} e convertidos para pressão osmótica (MPa) (Larcher 2004).

Posteriormente foi realizado bioensaio de germinação e crescimento com diásporos de alface, cebola e tomate utilizando-se soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para simular os potenciais osmóticos encontrados nos extratos. A preparação das soluções de PEG foi realizada seguindo as especificações de Villela et al. (1991) e o bioensaio de germinação e crescimento seguiu a metodologia descrita acima.

Além do potencial osmótico também foi medido o potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos com um phmetro. O pH obtido para todos os extratos manteve-se dentro dos limites tolerados para a germinação e desenvolvimento das espécies (Larcher 2004), assim os bioensaios foram dispensados.

Cálculos matemáticos e análise estatística

Foram calculadas:

- Porcentagem de germinação (G) (Ranal e Santana 2006):

$$G = \sum \frac{n_i}{n} \cdot 100$$

onde:

n_i : número de diásporos que germinam no tempo t_i ;

n : número total de diásporos.

- Tempo médio (TM) (Ranal e Santana 2006):

$$TM = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

t_i : tempo entre o início do experimento e a i ésima observação;

n_i : número de diásporos que germinam no tempo t_i ;

k : último tempo de germinação dos diásporos.

- Entropia informacional (I) (Ranal e Santana 2006):

$$I = - \sum [f_i \cdot \log_2(f_i)]$$

onde: $f_i = n_i / \sum n_i$

- Índice de resposta a efeitos alelopáticos (*RI*), calculado a partir da velocidade de germinação (Zhang et al. 2010):

$$RI = 1 - C/T \quad (T \geq C); \text{ ou } RI = C/T - 1 \quad (T < C)$$

Onde:

C: valor da velocidade do controle

T: valor da velocidade do tratamento; $RI < 0$ indica efeito inibitório.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. As variáveis porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*) e a entropia informacional (*I*) foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnoff). Quando foi constatada a normalidade dos dados, foi aplicada Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância e para os dados não normais foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações binárias, a 1% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico BioEstat 3.0 (Sociedade civil Mamirauá, CNPq). Devido à ausência de repetições, uma vez que o índice é calculado baseando-se na média obtida das repetições do controle, não foi efetuada análise estatística dos valores do índice de resposta alelopática (*RI*).

Para avaliar a similaridade entre as espécies foi utilizada a análise de conglomerados por meio da similaridade de Bray-Curtis. Foram plotados os valores de porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*), entropia informacional (*I*) e comprimento da parte aérea e raiz de todas as espécies alvo utilizadas. Os valores foram estandardizadas devido às diferenças nas escalas. Para a realização deste teste utilizou-se o programa estatístico PAST (Hammer et al. 2009).

Resultados

O potencial osmótico dos extratos de folhas das espécies doadoras variaram de -0,1 a -0,2 MPa. A partir dos resultados dos bioensaios de germinação e de crescimento, utilizando-se PEG 6000, foi constatado que estes potenciais não interferiram significativamente sobre a germinabilidade, tempo médio e desenvolvimento das plântulas bioindicadoras.

Os extratos aquosos das folhas das espécies doadoras *Eugenia bimarginata*, *E. puniceifolia*, *M. multiflora*, *M. splendens* e *M. tomentosa* reduziram significativamente a porcentagem de germinação ao menos de duas espécies alvo e extrato de *P. australe* reduziu apenas a germinabilidade dos diásporos de alface. A espécie alvo menos sensível a avaliação da germinabilidade foi a cebola, apresentando redução da porcentagem de germinação apenas quando submetida ao extrato de folhas de *M. tomentosa* (Fig. 1.1).

Com relação ao tempo médio, extratos aquosos de folhas das espécies doadoras *E. bimarginata* e *E. puniceifolia* foram capazes de aumentar significativamente este parâmetro em duas espécies alvo. Os extratos de folhas das espécies doadoras de *C. pubescens*, *M. lingua*, *M. splendens*, *P. laroutteanum* e *P. rufum* afetaram apenas o tempo médio de germinação de uma das espécies alvo (Fig. 1.1).

O índice de resposta a efeitos alelopáticos (RI) é um importante indicador da atividade dos extratos, ele foi calculado em relação à velocidade de germinação do controle e do tratamento com os diferentes extratos (Gao et al. 2009). Todos os diásporos apresentaram RI negativo, indicando presença de atividade alelopática de todas as espécies doadoras sob todas as espécies alvo (Fig. 1.1).

Valores elevados de entropia informacional refletem menor sincronia do processo germinativo. De acordo com os resultados, os tratamentos que reduziram significativamente os valores de entropia nos diásporos de alface, coincidiram com os tratamentos que produziram valores baixos de porcentagem de germinação devido à relação direta que existe entre estes parâmetros (Fig. 1.1). Os diásporos de cebola e alface foram insensíveis a este parâmetro, nenhum extrato alterou significativamente os valores de entropia em relação ao controle (Fig. 1.1).

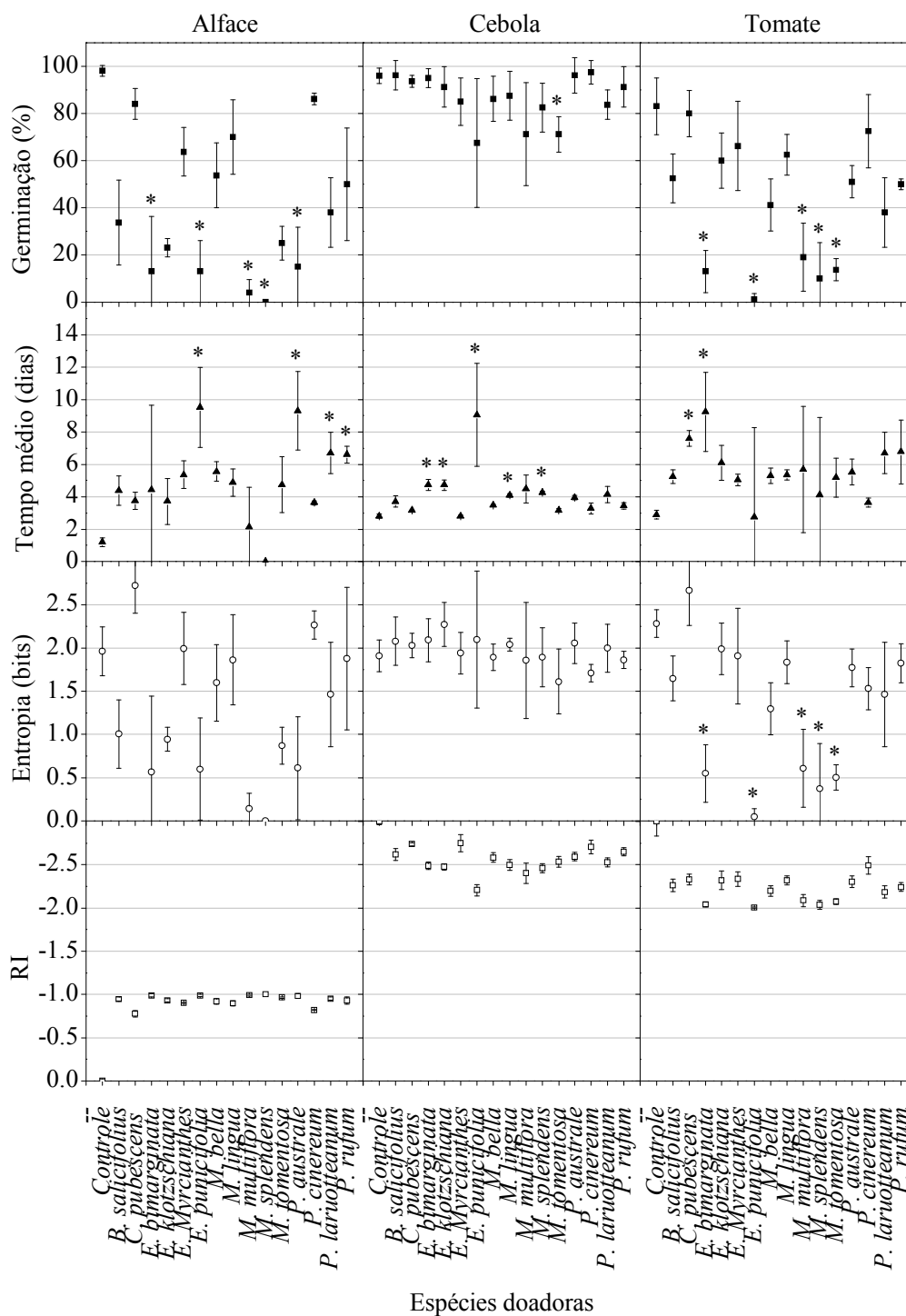


Figura 1.1. Valores médios de porcentagem de germinação (■), tempo médio (▲), entropia informacional de germinação (○) e índice de resposta alelopática (RI, □), de diásporos de alface, cebola, e tomate submetidas aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e controle (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*) significativamente diferente do controle.

As plântulas de alface, cebola e tomate submetidas aos tratamentos com extratos das folhas das espécies doadoras apresentaram desenvolvimento anormal das raízes, essas se encontravam deterioradas ou até necrosadas. As plântulas de tomate e cebola sofreram necrose da raiz primária e desenvolvimento das secundárias em todas as plântulas avaliadas.

De acordo com os resultados obtidos para o desenvolvimento inicial de plântulas, treze extratos de espécies doadoras provocaram necrose das raízes das plântulas das espécies alvo. Os comprimentos de raiz e parte aérea das plântulas das espécies alvo utilizadas, foram significativamente reduzidos pela ação dos extratos de folhas de *B. salicifolius*, *E. puniceifolia* e *P. australe*. O extrato de folhas de *M. splendens* reduziu apenas os comprimentos da raiz e parte aérea de plântulas de alface e a parte aérea das plântulas de cebola. O extrato de *M. lingua* reduziu o comprimento da raiz e parte aérea de plântulas de cebola e a parte aérea das plântulas de tomate. Outros extratos inibiram o crescimento de apenas uma das partes das plântulas (Fig. 1.2).

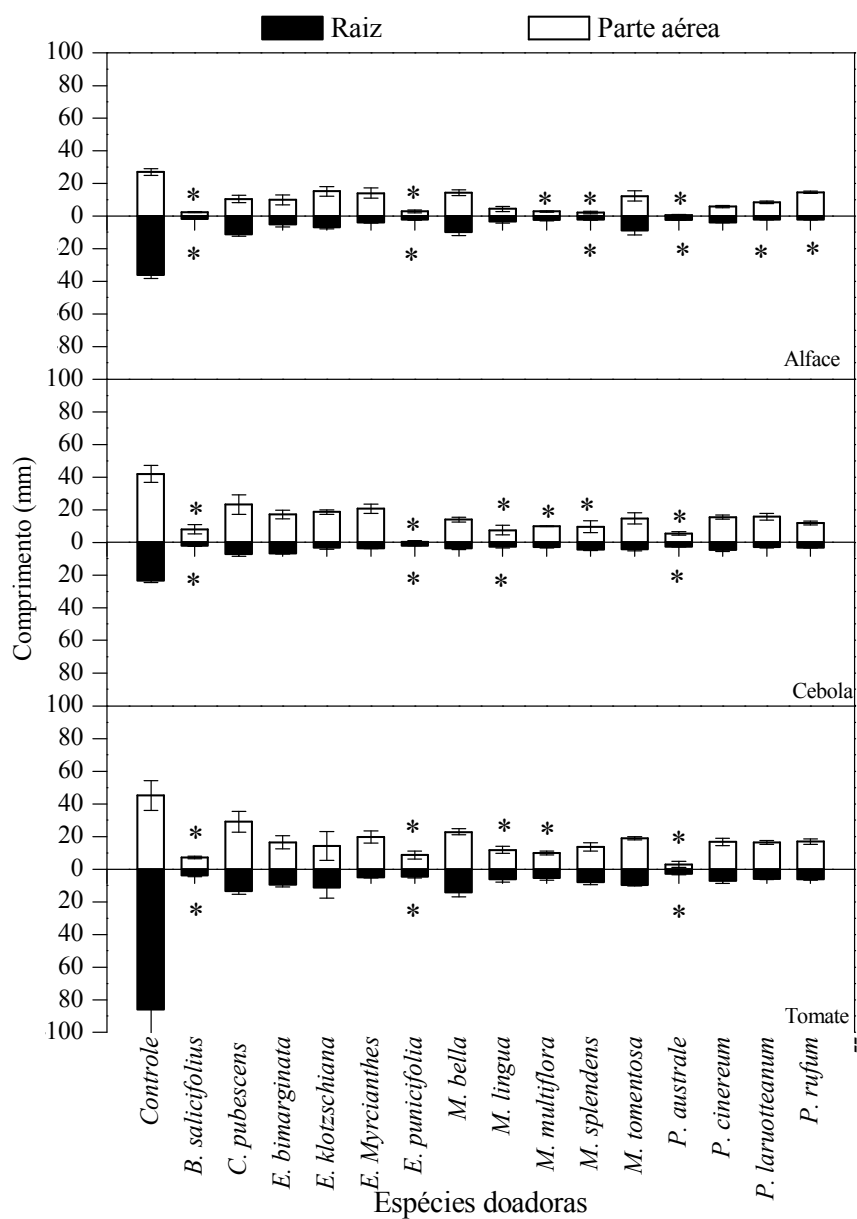


Figura 1.2. Valores médios do comprimento da parte aérea (□) e raiz (■) de plântulas de diásporos de alface, cebola, e tomate submetidas aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e controle (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$). (*) Diferem significativamente do controle.

As espécies doadoras foram ranqueadas em ordem decrescente de atividade, baseando-se no somatório da presença e ausência dos dados de germinabilidade, tempo médio, entropia e comprimento da parte aérea e da raiz, obtendo-se a seqüência mostrada na tabela 1.1. As espécies com maior atividade sobre a germinação dos diásporos alvo foram *E. bimarginata*, *E. puniceifolia* e *M. splendens* e, sobre o crescimento foram *B. salicifolius*, *E. puniceifolia* e *P. australe*. A espécie alvo mais sensível aos testes de germinação foi a cebola, no entanto nos testes de crescimento não houve diferenças quanto a sensibilidade das espécies alvo avaliadas (Tab.1.1).

Tabela 1.1. Ordem decrescente da freqüência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras. Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de alface (A), cebola (C) e tomate (T) para a porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*), entropia informacional (*I*) e comprimentos da parte aérea e raiz das plântulas.

Variáveis Espécies doadoras/alvo	<i>G</i>			<i>TM</i>			<i>I</i>			Comprimento						Total
										Parte aérea			Raiz			
	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	
<i>E. puniceifolia</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	11
<i>P. australe</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	8
<i>M. splendens</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	7
<i>M. multiflora</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	6
<i>B. salicifolius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	6
<i>E. bimarginata</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5
<i>M. lingua</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	4
<i>M. tomentosa</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
<i>P. laroutteanum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>P. rufum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>C. pubescens</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>E. klotzschiana</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. bella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. myrcianthes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. cinereum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

O dendrograma, baseado na atividade alelopática das espécies doadoras, mostra a formação de quatro grupos, estes refletem os resultados observados na tabela 1.1, na qual as espécies doadoras foram ranqueadas. O agrupamento I incluiu espécies ativas na supressão da germinação, com similaridade de 0,72. No grupo II, foram encontradas espécies agrupadas em função da elevada atividade dos extratos dessas espécies sobre o crescimento, com similaridade variando de 0,83 a 0,85. No grupo III encontram-se as espécies que apresentaram atividade reduzida tanto na germinação quanto no crescimento, neste foram encontrados os maiores valores de similaridade (0,84 a 0,93). Foi observado que no grupo IV as espécies doadoras mais ativas sobre a germinação e crescimento das espécies alvo, *M. splendens* e *M. multiflora* com similaridade de 0,78 e *E. puniceifolia* com similaridade de 0,66 (Fig. 1.3).

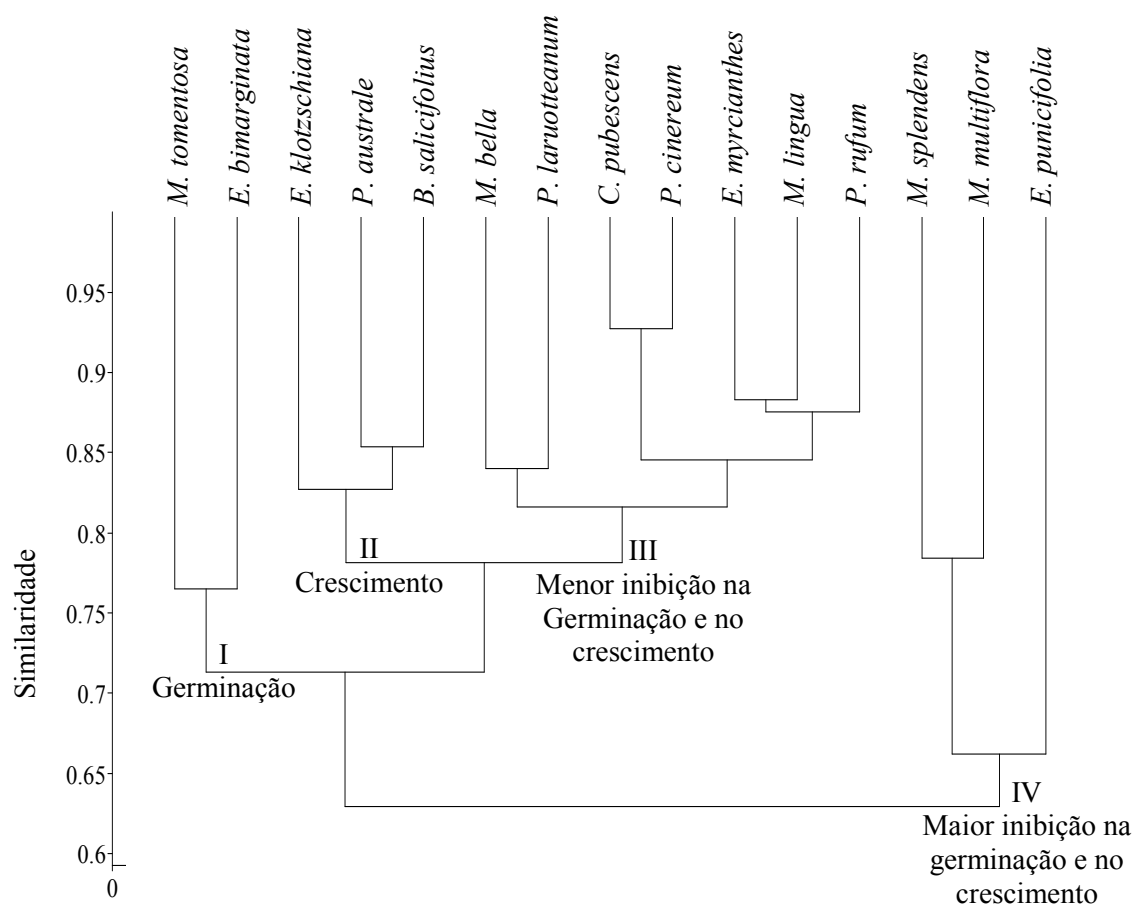


Figura 1.3. Dendrograma da Similaridade de Bray-Curtis para as variáveis de germinação e crescimento de alface, cebola e tomate entre as espécies doadoras avaliadas (Coeficiente de correlação: 0,85; min y:0,59).

Discussão

Os potenciais osmóticos encontrados nos extratos das espécies doadoras não interferiram significativamente sobre a germinação dos diásporos e desenvolvimento das plântulas. Outros trabalhos corroboram os resultados apresentados evidenciando que apenas potenciais osmóticos extremos influenciam nos resultados destes biotestes (Sodaeizadeh et al. 2009; Zhang et al. 2010).

Nesse trabalho doze dos quinze extratos foliares aquosos das espécies doadoras alteraram os valores de alguma das variáveis analisadas para a germinação de diásporos e/ou desenvolvimento de plântulas das espécies doadoras corroborando a hipótese testada.

Vários processos fisiológicos do diásporo podem ser afetados pela presença de fitotoxinas, os mais relatados foram a supressão das atividades de enzimas e/ou fitormônios relacionados com a quebra do material de reserva que é fornecido ao embrião no momento de seu desenvolvimento inicial (Kato-Noguchi e Macías 2004; Singh et al. 2009) e a inibição da absorção de água por meio de alterações na permeabilidade da membrana (Bogatek et al. 2005).

Os resultados deste trabalho mostraram que as espécies alvo respondem de maneira distinta aos extratos (Fig. 1.1 e Tab. 1.1), confirmando que a suscetibilidade das espécies alvo às substâncias fitotóxicas, sob condições de laboratório, depende das características fisiológicas e bioquímicas dessas espécies (Kobayashi 2004), ou seja, a resposta às fitotoxinas é espécie-dependente. A interferência dos extratos sobre a germinação depende do tamanho e estrutura das sementes (Hodgson e Mackey 1986), bem como da permeabilidade da casca (Hanley e Whiting 2005). Prati e Bossdorf (2004) observaram diferenças quanto à sensibilidade de duas espécies de *Geum sp.* a extratos de *Alliaria petiolata*. Batish et al. (2007) indicaram que extratos de folhas de *Tagetes minuta* teve maior atividade sobre *Cyperus rotundus* quando comparada a *Echinochloa crus-galli*.

Sodaeizadeh et al. (2009) testando atividade alelopática de diferentes órgãos de *Peganum harmala* observou diferenças nas respostas das espécies alvo avaliadas. Neste trabalho foi observado que a cebola apresentou menor sensibilidade quanto à porcentagem de germinação quando comparada com outras espécies alvo testadas. Com relação à velocidade de germinação, a espécie alvo menos afetada pelos extratos foi o tomate, corroborando com os trabalhos supramencionados. Devido a esta característica, os aleloquímicos são fundamentais tanto em ambientes naturais, influenciando na composição florística, quanto na agricultura, podendo ser utilizado como herbicida seletivo.

Assim como os aleloquímicos afetam a germinação das sementes, também interferem diretamente sobre reações fisiológicas e bioquímicas do crescimento e desenvolvimento dos órgãos das plantas (Weir et al. 2004). Nesse estudo observou-se que a raiz foi tão sensível quanto a parte aérea quando submetida aos extratos da maioria das espécies doadoras, confirmando que as espécies de Myrtaceae testadas apresentam

potencial alelopático. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Ahmed et al. 2008; Gao et al. 2009; Kato-Noguchi et al. 2010).

As plântulas submetidas ao estresse alelopático sofrem alterações sobre as enzimas presentes na membrana plasmática, como a ATPase da bomba de próton que é responsável pela formação de um gradiente eletroquímico. Sua inibição resulta na ausência de força motriz para efetuar o transporte de íons e metabólitos pela membrana. Isso reflete na redução da absorção de água e sais minerais pela raiz e, conseqüentemente prejudica as funções essenciais da planta como a fotossíntese, respiração e síntese de proteínas, resultando na redução do crescimento (Gniazdowska e Bogatek 2005). Além disso, os aleloquímicos estão associados à inibição da mitose e/ou rompimento da estrutura das organelas, como o núcleo e a mitocôndria. Observações microscópicas têm ajudado na detecção de anomalias no arranjo mitótico ou formação de paredes celulares atípicas podendo sugerir o rompimento dos microtúbulos ou alterações na biossíntese da parede celular (Zhang et al. 2010).

A segunda hipótese foi rejeitada, as espécies doadoras investigadas neste estudo não apresentaram agrupamento por gênero como esperado, corroborando os resultados obtidos por Santos e Salatino (2000) que não obtiveram sucesso na tentativa de agrupar espécies da Família Anonaceae presentes no cerrado de acordo com a composição de flavonóides presentes nas folhas.

Todas as espécies estudadas pertencem à tribo Myrteae, a qual apresenta sistemática obscura. Muitos autores estudaram Myrteae na tentativa de determinar o melhor agrupamento dentro da tribo (McVaugh 1968; Salywon et al. 2002; Snow et al. 2003; Wilson et al. 2005). Wilson et al. (2001) afirmaram que esta tribo forma um grupo parafilético, pois análises da seqüência de genes *matK* demonstraram que o grupo *Syzygium/Acmena* surgiram independentemente da subfamília Myrtoideae. Lucas et al. (2007) confirmaram que esta tribo é monofilética, excluindo o grupo em questão.

A tribo Myrteae é dividida em três subtribos: Myrtinae, que inclui os gêneros estudados *Blepharocalyx*, *Campomanesia* e *Psidium*; Eugeniinae no qual se inclui o gênero *Eugenia* e Myrciinae o gênero *Myrcia*.

Myrtinae e Eugeniinae são parafiléticas enquanto Myrciinae é monofilética (Lucas et al. 2005). Estudos baseados na seqüência do DNA nuclear sugeriram que o gênero *Psidium* (subtribo Myrtinae) pode ser parafilético (Salywon et al. 2002), porém Lucas et al.

(2005), utilizando seqüências do DNA nuclear e do plastídio, afirmaram que este gênero apresenta bom suporte para ser monofilético. O gênero *Blepharocalyx* (subtribo Myrtinae) é extremamente isolado, são necessários estudos futuros para avaliar a relevância deste grupo dentro da tribo (Lucas et al. 2005). O gênero *Eugenia* (subtribo Eugeniinae) apresenta sinais de parafiletismo (Lucas et al. 2005). Estudos do DNA nuclear e do plastídio também demonstraram que o gênero *Myrcia* é parafiletico (Lucas et al. 2005). Assim, pode-se observar que a maioria dos gêneros investigados neste trabalho apresenta uma tendência a ser parafileticos, corroborando os resultados observados.

Outro fator que explica a ausência de agrupamento dos gêneros é a variação quanto a composição e quantidade de aleloquímicos nessa família. Keszei et al. (2008) afirma que família Myrtaceae é conhecida pela alta concentração de terpenos nas folhas e pela grande variação qualitativa e quantitativa destes compostos de acordo com o *taxon*, população e indivíduo. Outros estudos fitoquímicos de folhas de Myrtaceae identificaram sesquiterpenos, triterpenos, flavonóides e alcalóides em *Calycorectes psidiiflorus* (Domingues et al. 2010), flavonóides, taninos e fenóis em *Plinia cauliflora* (Souza-Moreira et al. 2010) e flavonóides em *Baeckea frutescens* (Kamiya e Satake 2010).

Os resultados mostraram que doze dos quinze extratos foliares aquosos das espécies doadoras alteraram os valores de alguma das variáveis analisadas para a germinação de diásporos e/ou desenvolvimento de plântulas das espécies doadoras, no entanto, o índice de resposta alelopática (RI) aponta para um efeito alelopático uniforme em relação às 15 espécies testadas mostrando a importância dos aleloquímicos para a família Myrtaceae no ambiente de cerrado. Cada espécie demonstrou comportamento distinto em relação à atividade alelopática, não houve agrupamento por gênero.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e pela bolsa de produtividade em Pesquisa, concedida a segunda autora e ao Prof. Marcos Sobral pela confirmação da identificação das espécies.

Referências Bibliográficas

- Abraham D, Braquini WL, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL (2000) Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. **J Chem Ecol** 26:611-624
- Ackerly DD (2003) Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. **Int J Plant Sci** 164: 165–184
- Ahmed R, Hoque ATMR, Hossain MK (2008) Allelopathic effects of leaf litters of *Eucalyptus camaldulensis* on some forest and agricultural crops. **J For Res** 19(1):19–24
- Batish DR, Arora K, Singh HP, Kohli RK (2007) Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Prot** 26: 566–571
- Bogatek R, Oracz K, Gniazdowska A (2005) Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Fourth World Congress on Allelopathy. http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409_bogatekr.htm. Acessado em 22/06/2010
- Borghetti F, Ferreira AG (2004) Interpretação de resultados de germinação. In: Ferreira AG, Borghetti F (eds). **Germinação: do básico ao aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, pp. 209-222
- Cardoso CMV, Sajo MG (2006) Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Bot Bras** 20(3):657-669
- Domingues EA, Nakamura CV, Souza MC, Teixeira TS, Peixoto JLB, Sarragiotto MH, Vidotti GJ (2010) Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artêmia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiforus* (O. Berg). **Braz J Pharmacogn** 20(1):23-27
- Fine PVA, Miller ZJ, Mesones I, Irazuzta S, Appel HM, Stevens MHH, Sääksjärvi I, Schultz JC, Coley PD (2006) The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. **Ecology** 87:150–162
- Fukami T, Bezemer TM, Mortimer SR, van der Putten WH (2005) Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly. **Ecol. Lett.** 8:1283–1290
- Gao X, Li M, Gao Z, Li C, Sun Z (2009) Allelopathic effects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. **Weed Biol Manag** 9:243–249
- Gatti AB, Perez SCJGA, Lima MIS (2004) Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Bot Bras** 18(3): 459-472

- Gniazdowska A, Bogatek R (2005) Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiol Plant** 27(3B):395-407
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2009) PAST-PAlaeontological Statistics. versão 1.89. <http://folk.uio.no/ohammer/past/past.pdf>. Acessado em 20/06/2010
- Hanley ME, Whiting MD (2005) Insecticides and Arable Weeds: Effects on Germination and Seedling Growth. **Ecotoxicology** 14:483–490
- Haridasan, M. (2000) Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. **Ver. Bras. Fisiol. Veg.** 12: 54–64
- Hodgson JG, Mackey JML (1986) The ecological specialization of dicotyledonous families within a local flora: some factors constraining optimization of seed size. **New Phytol** 104(3):497-515.
- Inderjit, Duke SO (2003) Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta** 217(4):529-539.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland
- Kamiya K, Satake T (2010) Chemical constituents of *Baeckea frutescens* leaves inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Fitoterapia** 81:185–189
- Kato-Noguchi H, Macías FA (2004) Mode of action of MBOA on inhibition of plant germination. In: **Proceedings of Second European Allelopathy Symposium** “Allelopathy – from understanding to application”. Puławy, Poland, 96-97 pp.
- Kato-Noguchi H, Yamamoto M, Tamura K, Teruya T, Suenaga K, Fujii Y (2010) Isolation and identification of potent allelopathic substances in rattail fescue. **Plant Growth Regul** 60:127–131
- Keszei A, Brubaker CL, Carte R, Köllner T, Degenhardt J, Foley WJ (2008) Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry** 71:844-852
- Kobayashi K (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biol Manag** 4: 1–7
- Larcher W (2004) **Ecofisiologia Vegetal**. Rima Artes e Textos, São Carlos
- Lucas EJ, Belsham SR, Nic Lughadha EM, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW, Wilson PG (2005) Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Syst Evol** 251:35–51
- Lucas EJ, Harris SA, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughadha EM, Telford A, Gasson PE, Chase MW (2007) Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon** 56(4):1105-1128(24)
- Marquis RJ, Morais HC, Diniz IR (2002) Interactions among cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds.) **The cerrados of Brazil**. Columbia University Press, New York, pp. 306-328

- McVaugh R (1968) The genera of American Myrtaceae – an interim report. **Taxon** 17:354–418.
- Monteiro JAF, Prado CHBA (2006) Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. **Photosynthetica** 44:39-45
- Núñez-Farfán J, Fornoni J, Valverde PL (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** 38:541-566.
- Oliveros-Bastidas A (2008) El fenómeno alelopático: El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Rev. Quím. Viva** 1(7): 2-34
- Prati D, Bossdorf O (2004) Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **Amer J Bot** 91(2):285–288.
- Ranal MA, Santana DG (2006) How and why to measure the germination process? **Rev Brasil Bot** 29(1): 1-11
- Ribeiro JF, Walter BMT (1998) Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: **Cerrado: Ambiente e Flora**. Sano SM, Almeida SP (eds.). EMBRAPA, Planaltina, pp. 89-166
- Rice EL (1984) **Allelopathy**. Academic Press, New York
- Rizvi SJH, Haque H, Sing VK, Rizvi V (1992) A discipline called allelopathy. In: Rizvi SJH, Rizvi V (eds.). **Allelopathy. Basic and applied aspects**. Chapman and Hall Editors, London, pp. 1-10
- Salywon A, Snow N, Landrum LR (2002) Phylogenetic relationships of the berry fruited Myrtaceae as inferred from ITS sequences. In: Botany Conference 2002, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. <http://2002.botanyconference.org/section12/abstracts/239.shtml>, acessado em 22/06/ 2010
- Santos DYAC, Salatino MLF (2000) Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry** 55: 567-573
- Scrivanti LR, Zunino MP, Zygadlo JA (2003) *Tagetes minuta* and *Schinus areia* essential oils as allelopathic agents. **Biochem Syst Ecol** 31: 563–572
- Silva DM, Batalha MA (2010) Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecol** doi: 10.1007/s11258-010-9813-y
- Singh A, Singh D, Singh NB (2009) Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regul** 58:163–171
- Snow N, Guymer GP, Sawvel G (2003) Systematics of *Austromyrtus*, *Lenwebbia*, and the Australian species of *Gossia* (Myrtaceae). **Syst Bot Monogr** 65: 1–95
- Sodaeizadeh H, Rafieiohossaini M, Havlík J, Damme PV (2009) Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regul** 59:227–236

- Souza-Moreira, T.M.; Moreira, R.R.D.; Sacramento, L.V.S.; Pietro, R.C.L.R. 2010. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Braz J Pharmacogn** 20(1):48-53
- Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P (2010) Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresour Technol** 101:5677–5684
- Villela FA, Doni Filho L, Sequeira EL (1991) Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesq Agropec Bras** 26:1957-1968
- Watson L, Dallwitz MJ (2007) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://delta-intkey.com>. Acessado em 28/06/2010.
- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ (2002) Phylogenies and community ecology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 33:475–505.
- Weir T, Park S-W, Vivianco JM (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Curr Opin Plant Biol** 7:472-479
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn CJ (2005) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. **Plant Syst Evol** 251:3–19
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ (2001) Myrtaceae revisited: are assessment of infrafamilial groups. **Amer J Bot** 88:2013–2025
- Zhang Y, Gu M, Shi K, Zhou YH, Yu JQ (2010) Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. **Plant Soil** 327: 455–463

CAPÍTULO 2

EXTRATOS DE FOLHAS DE MYRTACEAE APRESENTAM POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE DE PLANTAS INVASORAS?

Resumo O uso indiscriminado de herbicidas tornou necessária a conversão do modelo agroquímico para um modelo de base agroecológica visando reduzir os impactos ambientais e as injúrias à saúde humana. Estudos acerca das interações alelopáticas podem ser úteis na busca por fitotoxinas produzidas por plantas que podem ser empregadas como herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente. De acordo com inventário florístico realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a família Myrtaceae é uma das mais representativas na vegetação de cerrado. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar se extratos aquosos de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens* e *Myrcia tomentosa*, todas pertencentes à família Myrtaceae presentes no cerrado, inibem o desenvolvimento de plantas invasoras, podendo ser aplicados em substituição a herbicidas comerciais. De acordo com os resultados expostos no primeiro capítulo deste trabalho, extratos de folhas de Myrtaceae apresentam atividade alelopática sobre espécies bioindicadoras. Assim, formulamos a hipótese: os extratos de folhas de Myrtaceae são capazes de controlar plantas invasoras de culturas, apresentando potencial para serem utilizados na fabricação de herbicidas naturais. Para testar esta hipótese foram avaliadas as atividades alelopáticas de folhas de quatro espécies de Myrtaceae. Os extratos foliares aquosos, nas concentrações de 5 e 10% (p/v), foram testados sobre a germinação e morfologia das três plantas invasoras mais frequentes em sistemas agrícolas e comparados com o herbicida Oxifluorfem comumente utilizado no controle dessas pragas. Os extratos promoveram atrasos acentuados na germinação e interferiram sobre o crescimento das plântulas. Extratos de *B. salicifolius* e *M. splendens* a 10% foram os mais ativos, de acordo com o ranqueamento efetuado. No presente estudo constatou-se o potencial e a eficiência dos extratos, uma vez que foram mais fitotóxicos às espécies invasoras que o herbicida, dessa forma a hipótese testada foi aceita, ressaltando que o extrato foliar de *M. tomentosa* destacou-se por demonstrar elevada atividade mesmo em baixa concentração.

Palavras chave: agroecossistemas, alelopatia, crescimento, germinação, oxifluorfem.

Abstract The indiscriminate use of herbicides has required the conversion of a model agrochemical for a model based in agroecological methods to reduce environmental impacts and injuries to human health. Studies about allelopathic effects may be useful in searching for phytotoxins produced by plants to be used as natural herbicides, more specific and less harmful to the environment. The inventory of flora compiled by the IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistic) indicates that the family Myrtaceae is one of the most representatives in the cerrado vegetation. Thus, the objective this work was evaluate if leaf aqueous extracts of *Blepharocalyx salicifolius*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens* and *Myrcia tomentosa*, all belonging to the Myrtaceae family present in the cerrado, inhibit the development of weeds, can be applied in replacement commercial herbicides. According to the results presented in the first chapter of this work, leaf aqueous extracts of Myrtaceae have allelopathic activity on bioindicators. Thus, we hypothesized: extracts of leaves of Myrtaceae may be able to control weeds in crops, with potential to be used in the manufacture of natural herbicides. To test this hypothesis we studied the allelopathic activity of leaves of four species of Myrtaceae. The aqueous leaf extracts at

concentrations of 5 and 10% (w/v) were tested on the germination and morphology of three common weeds of agricultural systems and compared with the Oxyfluorfen herbicide. The extracts promoted pronounced delay in the germination and interferences on the seedling growth. Extracts of *B. salicifolius* and *M. splendens* 10% were the most active, according to the ranking done. In this study we found the efficiency of these extracts, because these were more toxic to weeds than the herbicide, thus the hypothesis was accepted, emphasizing that the extracts leaves of *M. tomentosa* stood out for demonstrate high activity even at low concentration.

Key words: agroecosystem, allelopathy, growth, germination, oxyfluorfen.

Introdução

Segundo dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em 2010, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo pelo segundo ano consecutivo (Carneiro e Almeida 2010). Levantamentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (Sindag) mostram crescimento de 44,6% do consumo de agrotóxicos no Brasil no período de 2004 a 2008 (Carneiro e Almeida 2010). A utilização em larga escala de agrotóxicos tem trazido uma série de problemas ambientais, com impactos significativos na biota e riscos ao homem (Peres e Moreira 2007). A solução para o país está na conversão do modelo agroquímico para um modelo de base agroecológica (Carneiro e Almeida 2010).

A alelopatia se tornou uma importante ferramenta para identificar plantas que apresentam compostos bioativos (Oliveros-Bastidas 2008) a partir dos quais podem ser produzidos herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente (Macías et al. 1998). O conceito de alelopatia descreve a influência de um indivíduo sobre o outro em um ecossistema por meio de biomoléculas (aleloquímicos) produzidas pelas plantas, seja prejudicando ou favorecendo a planta alvo (Rizvi et al. 1999). Nos últimos anos os estudos sobre o processo alelopático têm focado a sua aplicação na agricultura. O uso de aleloquímicos como herbicidas sobre espécies invasoras de culturas visa desenvolver uma agricultura mais sustentável (Chon et al. 2003).

O uso excessivo de herbicidas sintéticos pode causar a poluição do solo, água e injúrias à saúde humana. Dentre os herbicidas utilizados no controle de plantas infestantes de culturas, destaca-se o Oxifluorfem (240 g/L de ingrediente ativo). Este herbicida é classificado como seletivo, de ação não sistêmica, pertencente ao grupo químico éter difenílico. É indicado para o controle de plantas invasoras, mono e eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial. É um produto considerado perigoso ao ambiente por ser altamente persistente e tóxico para organismos aquáticos e bioconcentrável em peixes (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Os compostos naturais possuem vantagens sobre os sintéticos, como ausência de moléculas halogenadas, menor meia vida (Duke et al. 2000; Rimando e Duke 2006) e a maioria é solúvel em água, o que proporciona atividade inibitória acentuada em baixas concentrações (Oliveros-Bastidas 2008). A necessidade de produzir herbicidas menos

impactantes ao ambiente tem gerado uma crescente busca de compostos naturais mais específicos em seu modo de ação e com produtos de degradação mais toleráveis pelos organismos (Oliveros-Bastidas 2008).

Em resposta aos danos provocados a saúde humana pelo uso de herbicidas, a demanda por produtos orgânicos vem aumentando nos últimos anos (Copping e Duke 2007). Na maioria dos países, o sistema de produção orgânica não permite o uso de herbicidas sintéticos, assim o manejo de plantas invasoras é problemático (Dayan et al. 2009), dessa maneira é necessário o desenvolvimento de produtos naturais com atividade herbicida que supram esse mercado emergente.

A família Myrtaceae destaca-se como uma das famílias mais abundantes e diversificadas nos ecossistemas brasileiros (Mori et al. 1983). O inventário da flora brasileira, efetuado pelo IBGE, indica que esta família é considerada uma das mais representativas do cerrado. Apesar da importância em riqueza e diversidade dessa família, pouco se conhece sobre o seu potencial alelopático. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar se extratos aquosos de folhas de quatro espécies de Myrtaceae, presentes no cerrado, inibem o desenvolvimento de plantas invasoras, podendo ser aplicados em substituição a herbicidas comerciais. De acordo com resultados preliminares de Imatomi (2010), extratos de folhas de Myrtaceae apresentam atividade alelopática sobre espécies bioindicadoras. Assim, foi formulada a hipótese: os extratos de folhas de Myrtaceae são capazes de controlar plantas infestantes de culturas, apresentando potencial para serem utilizados na fabricação de herbicidas naturais.

Para testar esta hipótese foram avaliadas as atividades alelopáticas de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens* e *Myrcia tomentosa* pertencentes à família Myrtaceae. Foram utilizadas duas concentrações para verificar a redução do potencial com a diluição do extrato, fator determinante para utilização em sistemas agroecológicos. Os extratos aquosos foram testados sobre a germinação e morfologia das espécies infestantes mais frequentes em sistemas agrícolas. Essas espécies provocam prejuízos de cerca de 95 bilhões de dólares anuais na produção de alimentos em nível mundial (FAO 2009) competindo por recursos com as espécies cultivadas e reduzindo a produção agrícola. Para evidenciar a atividade dos extratos, estes foram comparados com o herbicida Oxifluorfem comumente utilizado no controle dessas espécies infestantes de culturas.

Material e Métodos

Local de coleta

O material biológico foi coletado na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' O). O clima da região, segundo a classificação de Köppen é do tipo Cwa (tropical de altitude). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (Ribeiro e Walter 1998).

Material biológico

Para a confecção dos extratos foram selecionadas as espécies doadoras *Blepharocalyx salicifolius* Kuth O. Berg, *Myrcia multiflora* DC., *Myrcia splendens* DC. e *Myrcia tomentosa* DC. devido a riqueza dessas espécies no cerrado e à atividade alelopática diferenciada de cada uma. De acordo com Imatomi (2010) extratos aquosos de folhas de *B. salicifolius* atuam inibindo o desenvolvimento das plântulas alvo, extratos aquosos de folhas *M. tomentosa* atuam sobre a germinação de diásporos e extratos aquosos de folhas *M. multiflora* e *M. splendens* inibem intensamente a germinação e o desenvolvimento de espécies alvo bioindicadoras. As excicatas das espécies utilizadas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (HUFSCar) sob os números 8308 (*B. salicifolius*), 8316 (*M. multiflora*), 8317 (*M. splendens*) e 8318 (*M. tomentosa*).

As espécies de Myrtaceae encontradas no local de coleta foram marcadas e os indivíduos acompanhados até o período de floração e frutificação, o que possibilitou a identificação das espécies. As folhas de cada espécie foram coletadas assistematicamente em pelo menos cinco indivíduos em estágio vegetativo, no período seco (julho a outubro de 2008). As folhas coletadas foram secas em estufa sob 40 °C durante 48h, em seguida trituradas em moinho elétrico e armazenadas em embalagens plásticas em ambiente de laboratório (± 25 °C).

O potencial alelopático dos extratos provenientes das folhas das espécies doadoras foi testado sob os diásporos de três espécies invasoras *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (Poaceae, capim arroz), *Euphorbia heterophylla* L., (Euphorbiaceae, amendoim bravo) e *Ipomoea grandifolia* L., (Convolvulaceae, corda de viola). Para quebrar a dormência

mecânica presente nos diásporos de *I. grandifolia*, estes foram escarificados em ácido sulfúrico (98%) durante 5 minutos, em seguida lavados em água destilada, secos em papel de filtro e imediatamente utilizados nos bioensaios (Voll et al. 2010).

Preparação dos extratos

Os extratos aquosos foram obtidos a partir da mistura do pó das folhas com água destilada em concentração de 10% (1 g de pó: 10 mL de água destilada). Essa solução permaneceu em repouso durante 12 h em refrigerador. Decorrido esse período, o extrato foi filtrado a vácuo utilizando-se bomba elétrica e Kitasato com um funil de Buckner coberto com papel de filtro qualitativo. O extrato resultante foi recolhido em um béquer e a partir desse extrato concentrado foi feita diluição em água destilada para 5% (Gatti et al. 2004).

O controle positivo foi efetuado com o herbicida comercial Oxifluorfem (24% m/v) que é um herbicida de contato indicado para o controle de plantas invasoras, sejam gramíneas ou plantas de “folhas largas”, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A solução foi preparada em concentração de 10 e 5%, a partir da recomendação de uso (720 g.i.a.ha⁻¹).

Assim os bioensaios foram conduzidos utilizando-se extratos aquosos foliares ou o herbicida a 5 ou 10%, mais o grupo controle com água destilada.

Bioensaio de germinação

Os diásporos das espécies alvo foram colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 5 mL do extrato foliar aquoso ou herbicida (controle positivo) ou água destilada (controle negativo).

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 20 diásporos por placa de Petri. As placas de Petri contendo os diásporos foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 27 °C com fotoperíodo de 12 horas, seguindo avaliações prévias realizadas para a determinação das condições adequadas para as espécies alvo.

As contagens foram realizadas em intervalos de 12 horas, até totalizar 15 dias após a semeadura. Foram consideradas germinados os diásporos com protrusão de uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios (Borghetti e Ferreira 2004).

Bioensaio de crescimento

Os diásporos utilizados nesse bioensaio foram previamente germinados em água (2 a 4 mm de radícula), posteriormente foram distribuídos em caixas plásticas transparentes de 500 mL (14x10 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 13 mL de extrato foliar aquoso a 5 e 10% ou herbicida a 5 e 10% (controle positivo) ou água destilada (controle negativo) e tampadas. Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições de 10 diásporos por caixa plástica. As caixas foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 27 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias foram medidos os comprimentos da parte aérea e da raiz primária com um paquímetro digital e avaliadas as anomalias das plântulas.

Potencial osmótico e hidrogeniônico dos extratos

Os potenciais osmóticos dos extratos foram medidos utilizando um osmômetro. As medidas de potencial osmótico foram obtidas em mOsm.Kg⁻¹ e convertidos para pressão osmótica (MPa) (Larcher 2004).

Posteriormente foi realizado bioensaio de germinação e crescimento com as espécies receptoras utilizando-se soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para simular os potenciais osmóticos encontrados nos extratos. A preparação das soluções de PEG foi realizada seguindo as especificações de Villela et al. (1991) e o bioensaio de germinação e crescimento seguiu a metodologia descrita anteriormente.

Além do potencial osmótico também foi medido o potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos com um pHmetro. O pH obtido para todos os extratos se manteve dentro dos limites tolerados para a germinação e desenvolvimento das espécies (Larcher 2004) e, assim os bioensaios foram dispensados.

Cálculos matemáticos e análise estatística

Foram calculadas para o bioensaio de germinação a porcentagem de germinação (*G*), tempo médio de germinação (*TM*), a entropia informacional (*I*) (Ranal e Santana 2006) e o índice de resposta a efeitos alelopáticos (*RI*) (Zhang et al. 2010).

Os dados de comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas foram calculados em porcentagens de inibição/estímulo em relação ao controle, onde zero indica o mesmo

valor do controle, valores positivos indicam estímulo, e valores negativos inibição (Macías et al. 2006).

O delineamento experimental, em laboratório, foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnoff). Quando foi constatada a normalidade dos dados, foi aplicada Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância e para os dados não normais foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações binárias, a 1% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico BioEstat 3.0 (Sociedade civil Mimirauá, CNPq).

Resultados e Discussão

O potencial osmótico dos extratos de folhas das espécies doadoras variaram de -0,1 (*Myrcia splendens*) a -0,19 MPa (*M. multiflora*). A partir dos resultados dos bioensaios de germinação e de crescimento, utilizando-se PEG 6000, foi constatado que estes potenciais não interferiram significativamente sobre a germinabilidade, tempo médio e desenvolvimento das plântulas das espécies invasoras. Outros trabalhos corroboram os resultados apresentados, evidenciando que apenas potenciais osmóticos extremos influenciam sobre a germinação e crescimento de espécies vegetais (Sodaeizadeh et al. 2009; Zhang et al. 2010).

Os extratos aquosos foliares de todas as espécies e o herbicida não apresentaram efeito inibitório sobre a porcentagem de germinação das espécies alvo não diferindo significativamente ($p < 5\%$) do controle (Fig. 2.1). Com relação ao tempo médio de germinação, observou-se que os diásporos de amendoim bravo apresentaram aumento significativo ($P < 5\%$) do tempo médio de germinação quando submetidos aos extratos foliares aquosos de todas as espécies doadoras nas duas concentrações testadas (Fig. 2.1). Todos os extratos foliares aquosos e o herbicida, nas duas concentrações, ampliaram o tempo médio de germinação dos diásporos de capim arroz (Fig. 2.1). Os extratos aquosos de folhas de *M. splendens* e *M. tomentosa* nas duas concentrações e *M. multiflora* a 10%, aumentaram o tempo médio de germinação dos diásporos de corda de viola (Fig. 2.1). Matsumoto et al. (2010) trabalhando com as mesmas espécies infestantes de cultura, verificou que a fração acetato de etila de *Annona glabra* (Annonaceae), obtida da partição

líquido-líquido com hexano e acetato de etila, não foi capaz de reduzir a porcentagem de germinação dos diásporos de *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*. No entanto, atrasou o processo germinativo dos diásporos de *E. crus-galli*, mas não interferiu sobre o tempo médio de germinação das diásporos de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*. Seyyednejad et al. (2010) verificando o potencial alelopático de extrato aquoso de casca de 13 cultivares de arroz (*Oryza sativa*) sobre a espécie alvo *E. crus-galli*, observou que nenhum extrato testado reduziu significativamente a porcentagem de germinação dos diásporos, corroborando os resultados encontrados nesse trabalho.

Embora a porcentagem final de germinação não tenha sido afetada pelos extratos foliares aquosos, os resultados de tempo médio evidenciaram a atividade acentuada dos extratos em relação ao herbicida. Muitas vezes o efeito alelopático não se manifesta sobre a porcentagem final de germinação, mas sobre a velocidade de germinação dos diásporos ou sobre outro parâmetro do processo germinativo (Ferreira 2004). De acordo com Fenner (2000) o tempo de germinação é um fator crucial na sobrevivência das plântulas, refletindo sobre o crescimento e desempenho nos estágios subseqüentes do desenvolvimento. Plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido (Jefferson e Pennachio 2005) e, como conseqüência, podem ser mais suscetíveis a estresses, a predação e terem menor chance na competição por recursos.

As alterações no padrão de germinação podem ser o resultado de processos fisiológicos da semente que são afetados pela presença de fitotoxinas, os mais relatados foram a supressão das atividades de enzimas e/ou fitormônios relacionados com a hidrólise do material de reserva que é fornecido ao embrião no momento de seu desenvolvimento inicial (Kato-Noguchi e Macías 2004; Singh et al. 2009) e a inibição da absorção de água por meio de alterações na permeabilidade das membranas (Bogatek et al. 2005).

Aumentos nos valores de entropia informacional indicam alterações na sincronia das reações metabólicas que ocorrem durante o processo germinativo (Ranal et al. 2009). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os valores de entropia informacional dos diásporos de amendoim bravo submetidos aos extratos não diferiram do controle, indicando manutenção da sincronia no processo germinativo (Fig. 2.1). Os extratos aquosos de folhas de *B. salicifolius*, *M. multiflora* e *M. tomentosa*, em ao menos uma das concentrações aumentaram significativamente os valores de entropia dos diásporos de capim arroz (Fig. 2.1). Os diásporos de corda de viola apresentaram aumento dos valores

de entropia quando submetidos aos extratos aquosos de *B. salicifolius*, *M. splendens* e *M. tomentosa* nas duas concentrações e *M. multiflora* a 10% (Fig. 2.1).

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

O índice de resposta a efeitos alelopáticos (RI) é um importante indicador da atividade dos extratos, ele foi calculado em relação à velocidade de germinação do controle e do tratamento com os diferentes extratos (Gao et al. 2009). Todos os diásporos tratadas com os extratos apresentaram RI negativo, indicando presença de atividade alelopática dos extratos das espécies testadas. O herbicida nas duas concentrações inibiu os diásporos das espécies alvo utilizadas e na concentração a 10% proporcionou pequeno estímulo aos diásporos de amendoim bravo (Fig. 2.1).

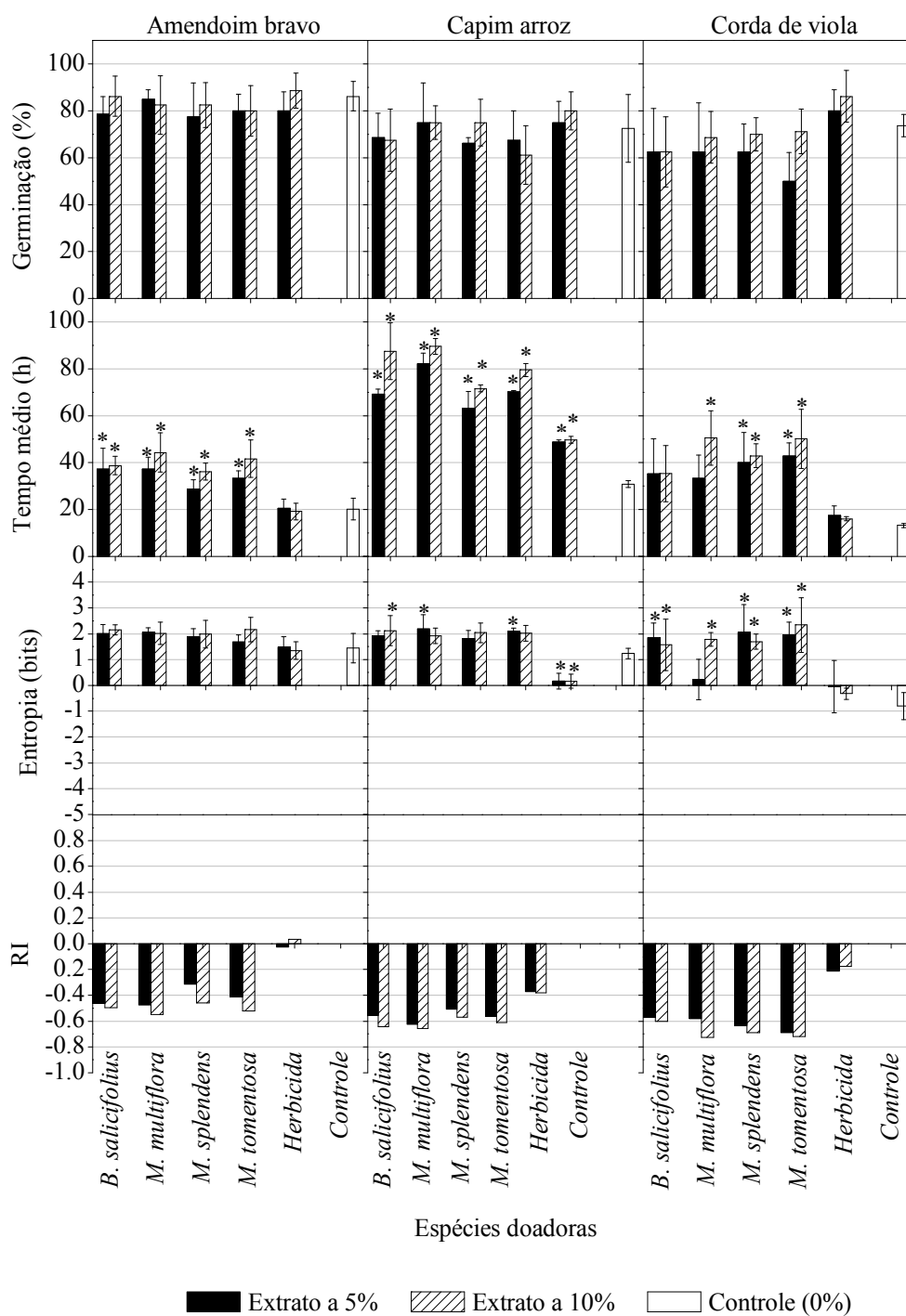


Figura 2.1. Valores médios de porcentagem de germinação, tempo médio, entropia informacional e índice de resposta a efeitos alelopáticos (RI) da germinação de diásporos de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola submetidas aos extratos aquosos, nas concentrações de 5 e 10%, de folhas das espécies doadoras, herbicida Oxifluorfem (controle positivo) e água destilada controle (controle negativo) (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*) significativamente diferente do controle.

Assim como os aleloquímicos afetam a germinação das sementes, também interferem diretamente sobre reações fisiológicas e bioquímicas do crescimento e desenvolvimento dos órgãos das plantas (Weir et al. 2004). Todos os extratos de folhas das espécies de Myrtaceae na concentração de 10% reduziram o comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas de amendoim bravo e extratos de folhas de *B. salicifolius* e *M. tomentosa* a 5% inibiram apenas a parte aérea, assim como o herbicida nas duas concentrações testadas. Nas plântulas de capim arroz foi observado estímulo da parte aérea proporcionado pelo extrato de folhas de *M. tomentosa* a 5%, a raiz teve seu comprimento inibido por todos os extratos foliares nas duas concentrações, com exceção de *M. tomentosa* a 5%. O herbicida foi o único tratamento que inibiu a parte aérea e raiz das plântulas de capim arroz nas duas concentrações. As plântulas de corda de viola tiveram o comprimento da parte aérea e da raiz inibido pelos extratos de folhas de *B. salicifolius*, *M. splendens* e *M. tomentosa* na concentração de 10% e o comprimento da raiz foi inibido pelas duas concentrações de todos os extratos foliares testados e pelo herbicida (nas duas concentrações) (Fig 2.2).

Matsumoto et al. (2010) trabalhando com as mesmas espécies infestantes de cultura, verificou que a fração acetato de etila de *Annona glabra* (Annonaceae), obtida da partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila, afetou o crescimento de *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*. Seyyednejad et al. (2010) verificando o potencial alelopático de extrato aquoso de casca de 13 cultivares de arroz (*Oryza sativa*) sobre a espécie alvo *E. crus-galli*, observou que não houve efeito significativo sobre os comprimentos da parte aérea e raiz das plântulas

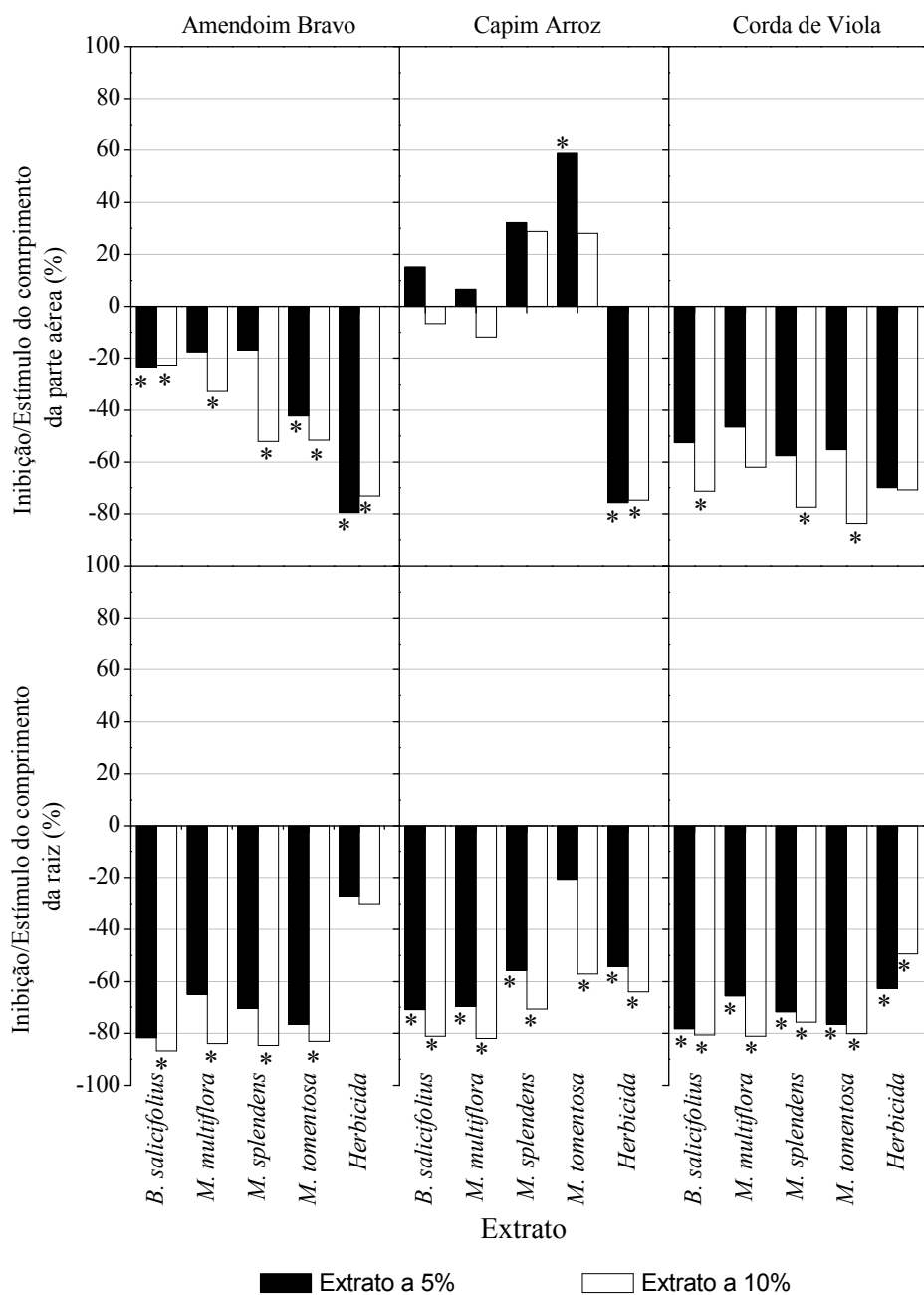


Figura 2.2. Valores médios da inibição/estímulo, em relação ao controle, do comprimento da parte aérea e raiz de plântulas dos diásporos de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola submetidos aos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras e ao herbicida Oxifluorfem nas concentrações de 5 e 10% (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$ e Tukey, $p < 5\%$). (*)Diferem significativamente do controle.

A emergência da plântula e seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese do indivíduo (Blum 1999). Segundo Jacobi e Ferreira (1991), do ponto de vista ecológico, a inibição do crescimento da plântula após a germinação controla o tamanho da população de modo mais eficiente, em comparação a inibição do processo germinativo, pois assim o banco de sementes é exaurido.

As partes aéreas das plântulas de capim arroz apresentaram resposta hormética aos extratos foliares de todas as espécies doadoras testadas, ou seja, os extratos foliares em baixas concentrações estimularam o crescimento e com o aumento da concentração o comprimento foi inibido. Várias espécies apresentam resposta hormética sob ação de substâncias alelopáticas incluindo vários tipos de herbicidas (Calabrese e Baldwin 2003; Duke et al. 2006).

De acordo com as Regras de Análises de sementes (Brasil 2009) as plântulas anormais são aquelas que não apresentam potencial para continuar o seu desenvolvimento. Baseando-se neste conceito, foram determinados quatro tipos de anomalias que prejudicam ou inviabilizam o desenvolvimento das plântulas: 1. Morte da plântula; 2. Necrose da raiz; 3. Inversão gravitrópica; e 4. Plântulas atrofiadas. Assim, neste trabalho foi possível quantificar e qualificar o tipo de anomalia provocada pelos extratos (Fig. 2.3).

Os aleloquímicos podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, nas quais a necrose é o sintoma mais evidente do efeito alelopático, inibindo o desenvolvimento da planta receptora (Ferreira e Áquila 2000), neste trabalho foi observada necrose em todas as plântulas submetidas a todos os extratos foliares testados, o herbicida proporcionou a necrose apenas em plântulas de amendoim bravo (Fig. 2.4).

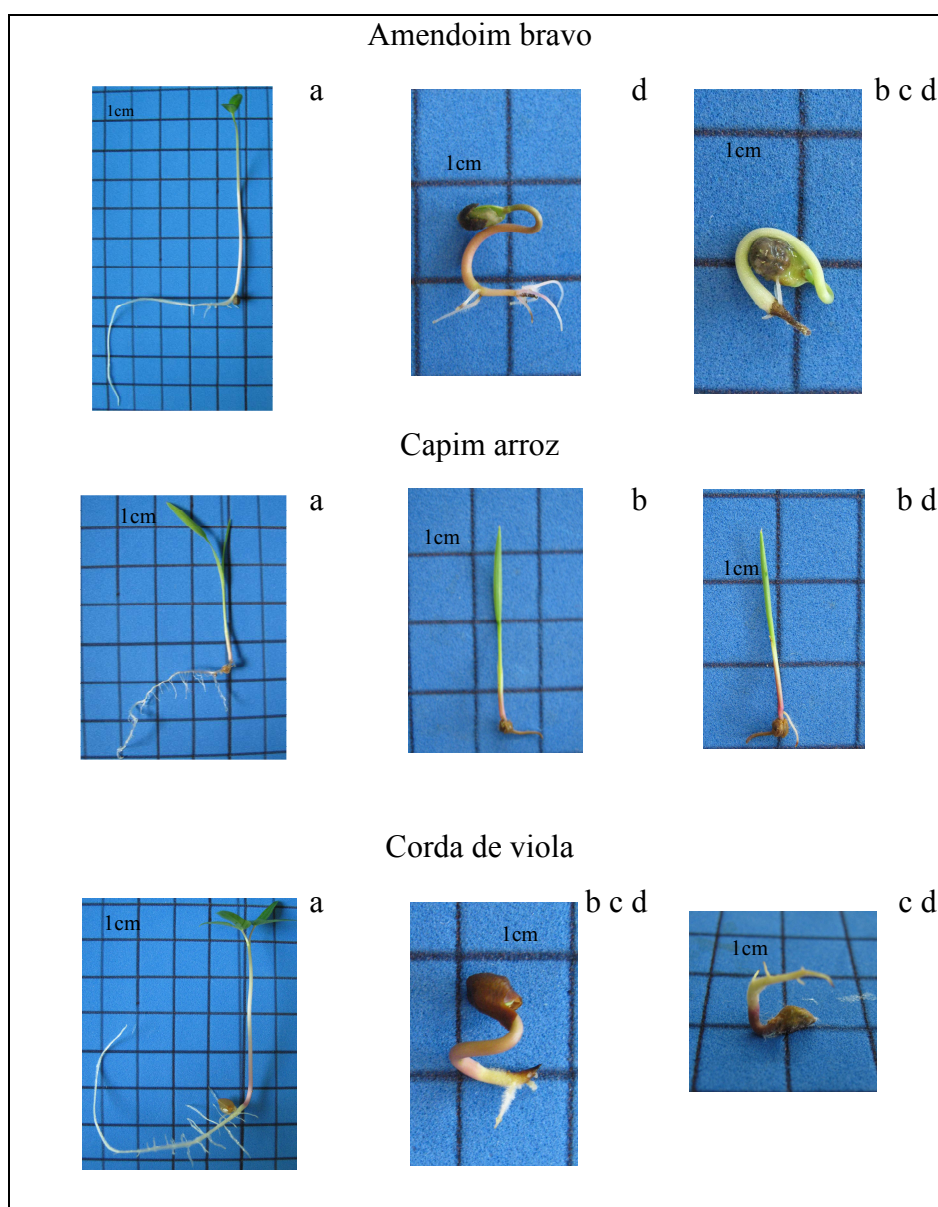


Figura 2.3. Anomalias observadas nas plântulas de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola. a) controle; b) necrose da raiz; c) inversão gravitrópica; d) plântulas atrofiadas.

As plântulas de amendoim bravo submetidas aos extratos de *M. splendens* a 10% e *M. tomentosa* a 5 e 10%; plântulas de capim arroz submetidas ao extrato de folhas de *M. tomentosa* a 10%; e as plântulas de corda de viola submetidas aos extratos de folhas de *B. salicifolius* e de *M. tomentosa*, ambas nas duas concentrações sofreram oxidação dos tecidos e rápida decomposição levando a morte dessas plântulas.

Grande parte das plântulas de amendoim bravo apresentou inversão gravitrópica, quando submetidas aos extratos, exceto as tratadas com extrato de folhas de *B. salicifolius* e de herbicida, ambas nas duas concentrações (Fig. 2.4). As plântulas de capim arroz não apresentaram inversão gravitrópica. Nas plântulas de corda de viola todos os extratos foliares promoveram esta anomalia, apenas o herbicida não provocou essa anomalia (Fig. 2.4).

Com relação ao desenvolvimento precoce de raiz secundária, todas as espécies alvo testadas apresentaram essa anomalia quando tratadas com os extratos foliares, apenas o herbicida não foi capaz de alterar este processo nas plântulas de capim arroz e corda de viola (Fig. 2.4).

A respeito do atrofiamento severo das plântulas, foi observado que as plântulas de amendoim bravo apresentaram-se atrofiadas quando submetidas aos extratos, com exceção do extrato de *M. multiflora* a 5% e herbicida a 5 e 10%, as plântulas de capim arroz não apresentaram esta alteração e todas as plântulas de corda de viola tratadas com os extratos exibiram atrofiamento, apenas o herbicida não promoveu esta alteração (Fig. 2.4).

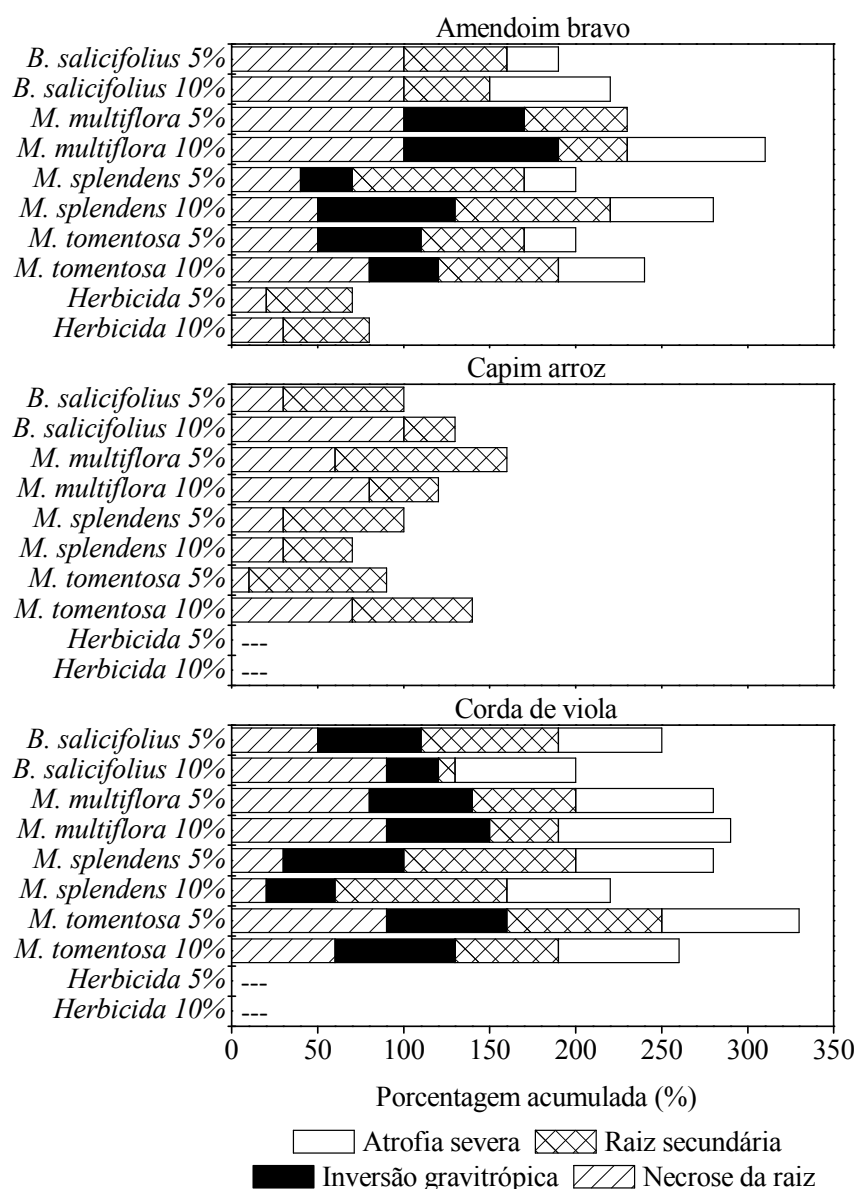


Figura 2.4. Porcentagem acumulada de anomalias proporcionadas pelos extratos aquosos de folhas de Myrtaceae e pelo herbicida, ambas nas concentrações de 5 e 10%, nas plântulas de amendoim bravo, capim arroz e corda de viola

O desenvolvimento e sobrevivência das plantas baseiam-se na sua habilidade de perceber e responder a mudanças ambientais, e essas respostas são freqüentemente moduladas por fitormônios. O hormônio etileno desempenha importante papel na adaptação da planta ao estresse (Luwig et al. 2005; Ogawa et al. 2005), exibindo intensificação de sua biosíntese quando as plantas são estressadas (Liu e Zhang 2004). O aumento na produção de etileno pode ampliar a tolerância ao estresse (Cao et al. 2007;

Jackson 2008) ou, em outros casos, aumentar a sensibilidade ao estresse levando a senescência prematura e morte celular (Xu et al. 2008). A resposta das células ao etileno também depende da sensibilidade dos tecidos ao hormônio, que pode ser influenciada por complexas interações com outros fitoreguladores (Stepanova e Alonso 2005; Sharabi-Schwager et al. 2010). Portanto, acredita-se que a morte precoce das plântulas observadas nesse trabalho pode estar relacionada com alterações no balanço hormonal em resposta ao estresse químico.

As citocininas e a auxina são hormônios chave que regulam o desenvolvimento da raiz, a diferenciação do tecido vascular e o gravitropismo da raiz, esses dois hormônios, junto com o etileno, regulam a iniciação da raiz lateral (Aloni et al. 2006).

As citocininas produzidas na coifa são consideradas os sinais primários da resposta gravitrópica, a falta desse fitoregulador altera a curvatura normal da raiz. A auxina e o etileno também estão envolvidos nesse processo, ao alterar a posição da plântula, ocorre acúmulo desses hormônios no ápice da raiz, assim o alongamento das células nessa região é inibido. Por outro lado, na porção superior, onde a concentração de auxina se torna menor, o alongamento é estimulado resultando na curvatura da raiz (Aloni et al 2006). De acordo com Buer et al. (2006) plântulas de *Arabidopsis* apresentaram a resposta gravitrópica, o alongamento e a curvatura radicular inibidos pela adição do precursor do etileno ACC (ácido carboxílico 1-aminociclopropano), indicando que o etileno modula esses processos. Assim, alterações nas concentrações desses fitormônios podem estar relacionadas à resposta gravitrópica anormal relatada nesse trabalho (Fig. 2.4).

A auxina é o principal hormônio envolvido no processo de formação da raiz lateral. Esse processo é complexo e envolve a interação da auxina com outros hormônios. No estágio de iniciação da raiz lateral, as células do periciclo são estimuladas pelo aumento na concentração de auxina e inibidas pelo aumento na concentração de citocinina (impede o aumento da concentração da auxina) e pelo etileno (inibe o transporte da auxina). Após a formação do primórdio radicular, a auxina passa a estimular seu crescimento enquanto a citocinina inibe. A emergência é estimulada pela auxina e pelo etileno e inibida pelo ácido abscísico (Fukaki e Tasaka 2009). A precocidade do surgimento das raízes laterais está relacionada a um desbalanço hormonal causado por possíveis injúrias no ápice da raiz (Dayan et al. 2000). Em geral, a deficiência de citocinina (promovida pela injúria à coifa) e altos níveis de auxina, acompanhados de elevadas concentrações de etileno (resposta ao

estresse químico) levam à formação precoce de raízes laterais, evento constatado nos resultados do presente trabalho (Fig. 2.4).

Observando o somatório das colunas da tabela 2.1, constatou-se que no processo germinativo os diásporos de capim arroz apresentaram atraso acentuado na germinação, enquanto os diásporos de corda de viola apresentaram menor sincronia, quando comparados aos demais diásporos testados.

Com relação ao comprimento das plântulas, o amendoim bravo foi a espécie com maior inibição do comprimento da parte aérea, enquanto as plântulas de capim arroz e corda de viola apresentaram inibição acentuada no comprimento das raízes (Tab. 2.1). A sensibilidade radicular aos aleloquímicos é bem documentada na literatura, sendo uma das características que melhor indica a ação alelopática de extratos vegetais (Seal e Pratley 2010; Maraschin-Silva e Áquila 2005).

Os resultados observados evidenciaram que as espécies alvo respondem de maneira distinta aos extratos (Tab. 2.1), confirmando que a suscetibilidade destas às substâncias fitotóxicas, sob condições controladas, depende das características fisiológicas e bioquímicas dessas espécies (Kobayashi 2004). Devido a esta característica, os aleloquímicos são fundamentais em sistemas agroecológicos, pois podem ser aplicados como herbicidas seletivos. Esses resultados corroboraram com os encontrados por Prati e Bossdorf (2004) que observaram diferenças quanto à sensibilidade de duas espécies de *Geum sp.* a extratos de *Alliaria petiolata*. Batish et al. (2007) indicaram que extratos de folhas de *Tagetes minuta* teve maior atividade sobre *Cyperus rotundus* quando comparada a *Echinochloa crus-galli*. Sodaiezhadeh et al. (2009) testando atividade de diferentes órgãos de *Peganum harmala* observou diferenças nas respostas das espécies alvo avaliadas. Extratos de sementes, folhas e caules de *Annona crassiflora*, uma espécie de cerrado, apresentou potencial para o manejo das espécies invasoras *Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*, a sensibilidade das espécies alvo variou em resposta aos extratos (Inoue et al. 2010).

A partir do somatório das linhas da Tabela 2.1 foi possível ordenar de forma decrescente os extratos em relação à presença de atividade alelopática. As menores inibições foram proporcionadas pelo herbicida, nas duas concentrações e *M. multiflora* e *M. splendens*, ambas a 5%. Foi averiguado que quanto maior a concentração dos extratos maior a inibição proporcionada. Esta relação foi menos acentuada nos extratos de folhas de

M. tomentosa na qual a resposta das espécies alvo ao extrato a 5% foi semelhante a 10%, este é um indicio de potencial para a produção de herbicidas naturais.

Tabela 2.1. Ordem crescente da frequência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos aquosos de folhas das espécies doadoras. Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de amendoim bravo (A), capim arroz (B) e corda de viola (C) para a porcentagem de germinação (*G*), tempo médio (*TM*), entropia informacional (*I*) e comprimentos da parte aérea e raiz das plântulas.

Variáveis		Comprimento												Total			
		<i>G</i>			<i>TM</i>			<i>I</i>			Parte aérea				Raiz		
Espécies doadora/alvo		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Herbicida	05%	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	05
Herbicida	10%	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	05
<i>M. multiflora</i>	05%	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	05
<i>M. splendens</i>	05%	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	05
<i>B. salicifolius</i>	05%	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	06
<i>M. tomentosa</i>	05%	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	07
<i>M. tomentosa</i>	10%	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	08
<i>M. multiflora</i>	10%	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	08
<i>B. salicifolius</i>	10%	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	09
<i>M. splendens</i>	10%	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	09
Total		0	0	0	7	10	4	0	3	7	8	2	3	4	9	10	

Em geral, a inibição do crescimento de espécies invasoras em resposta a diferentes extratos de plantas é bem documentada (Duke et al. 1998; Olofsdotter et al. 2002; El-Rokiek et al. 2006, 2009, 2010), porém não há relatos sobre o potencial de uso de espécies

de Myrtaceae do cerrado brasileiro. No presente estudo constatou-se o potencial e a eficiência desses extratos, uma vez que estes foram mais fitotóxicos às espécies invasoras que o herbicida, dessa forma a hipótese testada foi aceita, ressaltando que o extrato foliar de *M. tomentosa* destacou-se por demonstrar elevada atividade mesmo em baixa concentração.

Referências Bibliográficas

- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI (2006) Role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany** 97: 883-893
- Batish DR, Arora K, Singh HP, Kohli RK (2007) Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection** 26: 566-571.
- Blum U (1999) Designing laboratory plant debris-soil bioassays: some reflections. In: Inderjit, Dakshini KMM, Foy CL (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC. 17-23 pp.
- Bogatek R, Oracz K, Gniazdowska A (2005) Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. **Fourth World Congress on Allelopathy**.
- Borghetti F, Ferreira AG (2004) Interpretação de resultados de germinação. In: Ferreira AG, Borghetti F (orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 209-222 pp.
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 365 p.
- Buer CS, Sukumar P, Muday GK (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of arabisopsis. **Plant Physiology** 140: 1384-1396.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Hormesis: the dose-response revolution. **Annual review of pharmacology and toxicology** 43: 175-197
- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, Zhang JS (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. **Plant Physiology** 143: 707-719.
- Carneiro FF e Almeida VES (2010). UNB <http://www.unb.br/noticias/unbagencia/artigo.php?id=279#> (acessado em 03/11/2010)
- Chon SU, Kim YM, Lee JC (2003) Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Research** 43: 444-450
- Copping LG, Duke SO (2007) Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science** 63: 524-554

- Dayan FE, Romagni JG, Duke SO (2000) Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology** 26: 2079-2094
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009) Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17: 4022–4034
- Duke SO, Dayan FE, Rimando AM (1998) Natural products as tools for weed management. **Weed Research** 40 (1): 99–111
- Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM (2000) Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research** 40: 99-111
- Duke SO, Cedergreen N, Velini ED, Belz RG (2006) Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? **Outlooks on Pest Management** 17: 29-33
- El-Rokiek KG, El-Shahawy TA, Sharara FA (2006) New approach to use rice straw waste for weed control II. The effect of rice straw extract and fusilade (herbicide) on some weeds infesting soybean (*Glycin max* L.). **International Journal of Agriculture and Biology** 8 (2): 269–275
- El-Rokiek KG, Aid RA (2009) Allelopathic effects of *Eucalyptus citriodora* on amaryllis and associated grassy weed. **Planta Daninha** 27: 887–899
- El-Rokiek, KG; El-Din, SAS; Sharara, FAA (2010) Allelopathic behaviour of *Cyperus rotundus* L. on both *Chorchorus olitorius* (broad leaved weed) and *Echinochloa crus-galli* (grassy weed) associated with soybean. **Journal of Plant Protection Research** 50 (3): 274-279.
- FAO (2009) The lurking menace of weeds. <<http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/>>. Acessado em: 03/11/2010.
- Fenner M (2000) **Seeds. The ecology of regeneration in plant communities** 2nd ed CABI publishing, New York
- Ferreira AG, Áquila MEA (2000) Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 175-204
- Ferreira AG (2004) Interferência: competição e alelopatia. p. 251-262. In: Ferreira A.G.; Borghetti F. (Orgs). **Germinação do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, 323p.
- Fukaki H, Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. **Plant Molecular Biology** 69: 437-449
- Gao X, Li M, Gao Z, Li C, Sun Z (2009) Allelopathic effects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. **Weed Biology and Management** 9:243–249
- Gatti AB, Perez SCJGA, Lima MIS (2004) Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica** 18(3): 459-472

- Inoue MH, Santana DC, Souza Filho APS, Possamai ACS, Silva LE, Pereira MJB, Pereira KM (2010) Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: Efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha** 28(3): 489-498
- Jackson MB (2008) Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. **Annals of Botany** 101: 229–248.
- Jacobi US, Ferreira AG (1991) Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26: 935-943
- Jefferson LV, Pennachio M (2005) Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. **Journal of Arid Environments** 55:275-285.
- Kato-Noguchi H, Macías FA (2004) Mode of action of MBOA on inhibition of plant germination. In: **Proceedings of Second European Allelopathy Symposium** “Allelopathy – from understanding to application”. Puławy, Poland, 96-97 pp.
- Kobayashi K (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management** 4: 1–7
- Larcher W 2004. **Ecofisiologia vegetal**. Rima Artes e Textos, São Carlos
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, as tress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 16: 3386–3399.
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymar KG, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones JDG, Romeis T (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 102: 10736–10741
- Macías, FA, Varela RM, Torres A, Oliva RM, Molinillo JMG (1998) Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. **Phytochemistry** 48 (4): 631-636.
- Macías FA, Chinchilla N, Varela RM, Molinillo JMG (2006) Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. **Steroids** 7(1): 603-608
- Maraschin-Silva F, Áquila MEA (2005) Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. **Iheringia** 60 (1): 91-98
- Matsumoto RS, Ribeiro JPN, Takao LK, Lima MIS (2010) Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica** 24(3): 631-635. 2010
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento http://bopar.com.br/arquivos/20090915_103917_4.pdf (Acessado em 28/10/2010)
- Mori SA, Boom BM, Carvalino AM, Santos TS (1983) Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica** 1:68-70

- Ogawa T, Pan L, Kawai-Yamada M, Yu LH, Yamamura S, Koyama T, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F, Uchimiya H (2005) Functional analysis of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death. **Plant Physiology** 138:1436–1445
- Oliveros-Bastidas AJ (2008) El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva** 7(1): 1-34
- Olofsdotter M, Jensen LB, Courtois B (2002) Improving crop competitive ability using allelopathy – an example from rice. **Plant Breeding** 121 (1): 1–9
- Peres F, Moreira JC (2007) Saúde e Ambiente e Sua Relação Com o Consumo de Agrotóxicos em um Pólo Agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil; **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro
- Prati D, Bossdorf O (2004) Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **American Journal of Botany** 91(2):285–288.
- Ranal MA, Santana DG (2006) How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica** 29: 1-11.
- Ranal MA, Santana DG, Ferreira WR, Mendes-Rodrigues C (2009) Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. **Revista Brasileira de Botânica** 32(4): 849-955
- Ribeiro JF, Walter BMT (1998) Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Cerrado: Ambiente e Flora. Sano SM, Almeida SP (eds.). EMBRAPA, Planaltina, 89-166 pp.
- Rimando AM, Duke SO (2006) Natural Products for Pest Management. In Rimando A, et al. Natural Products for Pest Management; ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, DC
- Rizvi SJH, Tahir M, Rizvi V, Kohli RK, Ansari A (1999) Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Science** 18 (6): 773-796
- Santana DG, Ranal MA, Mustafa PCV, Silva RMG (2006) Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal** 17(1): 43-52
- Seal AN, Pratley JE (2010) The specificity of allelopathy in rice (*Oryza sativa*). **Weed Research** 50: 303–311
- Seyyednejad SM, Koochak H, Najafabade FP, Kolahi M (2010) Allelopathic effect of aquatic hull extract of rice (*Oryza sativa* L.) on growth of *Silybum marianum* and *Echinochloa crus-galli*. **African Journal of Agricultural Research** 5(16): 2222-2226
- Sharabi-Schwager M, Samach A, Porat R (2010) Over expression of the CBF2 transcriptional activator in *Arabidopsis* suppresses the responsiveness of leaf tissue to the stress hormone ethylene. **Plant Biology** 12: 630–638
- Singh A, Singh D, Singh NB (2009) Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation** 58:163–171

- Sodaeizadeh H, Rafieiohossaini M, Havlík J, Damme PV (2009) Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation** 59:227–236
- Stepanova AN, Alonso JM (2005) Ethylene signalling and response pathway: a unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. **Physiologia Plantarum** 123: 195–206
- Villela FA, Doni Filho L, Sequeira EL (1991) Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26:1957-1968
- Voll E, Gazziero DLP, Adegas FS (2010) Aconitic acid on seeds of weed species from different locations. **Planta daninha** 28(1): 13-22
- Weir T, Park S-W, Vivianco JM (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology** 7: 472-479
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D (2008) Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry** 283: 26996–27006.
- Zhang Y, Gu M, Shi K, Zhou YH, Yu JQ (2010) Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. **Plant Soil** 327: 455–463

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *Myrcia tomentosa* (MYRTACEAE)

Resumo Estudos sobre interações alelopáticas são úteis na busca por fitotoxinas naturais, produzidas por plantas ou microrganismos a serem empregadas como herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente. Devido ao melhoramento e refinamento das técnicas de isolamento e caracterização de compostos químicos, a alelopatia se tornou uma importante ferramenta para identificar plantas bioativas. *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) é uma espécie arbórea, decídua, heliófita e pioneira. No cerrado *sensu stricto*, esta espécie inibe o desenvolvimento de outras plantas em seu entorno, indicando possível interferência alelopática. Embora esta espécie apresente potencial fitotóxico, ainda não há estudos que comprovem a sua atividade ou que caracterizem o seu perfil químico. Nesse trabalho foi testada a seguinte hipótese: As folhas de *M. tomentosa* apresentam fitotoxinas promissoras na busca por compostos bioativos. Para testar esta hipótese foi efetuado isolamento e identificação de compostos majoritários presentes nas folhas de *M. tomentosa*. Foram isolados dois compostos do extrato de acetato de etila: juglanina e avicularina, o que as diferencia é a hidroxila ligada ao carbono 3' na molécula de avicularina. De acordo com os resultados, a juglanina foi a substância que promoveu maior inibição do crescimento de coleótilos de trigo. O presente trabalho relatou pela primeira vez a presença dos flavonóides kaempferol e quercetina em uma espécie de Myrtaceae do cerrado e deu embasamento para futuros estudos relativos a bioprospecção da espécie *M. tomentosa*, da qual não se encontrou nenhum relato de estudos alelopáticos, fracionamento e identificação de compostos químicos.

Palavras-chave: alelopatia, flavonóides glicosilados, fitotoxinas, prospecção de aleloquímicos.

Abstract Studies on allelopathic interactions may be useful in the search for natural phytotoxins, produced by plants or microorganisms to be used as natural herbicides, more specific and less harmful to the environment. Due to the improvement and refinement of techniques for isolation and characterization of chemical compounds, allelopathy has become an important tool to identify bioactive plants. *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) is a deciduous tree, shade intolerant and pioneer. In the cerrado *sensu stricto*, this species inhibits the growth of other plants around it, indicating possible production of allelochemicals. Although this species show phytotoxic potential, there are no studies proving their activity or characterizing their chemical profile. In this study we tested the following hypothesis: The leaves of *M. tomentosa* present promising phytotoxins in the search for bioactive compounds. To test this hypothesis was carried out isolation and identification of major compounds in the leaves of *M. tomentosa*. Were isolated two compounds from the ethyl acetate extract: juglanin and avicularin, the difference between both is the presence of one hydroxyl attached to carbons 3' in avicularina molecule. According to the results, juglanin was the substance that caused more growth inhibition of wheat coleoptile. This paper is the first report of the presence of the flavonoids quercetin and kaempferol in species of Myrtaceae of cerrado (Brazilian savanna) and gave foundation for future studies on bioprospecting of the *M. tomentosa*, which did not find any reports of allelopathic studies, fractionation and identification of chemical compounds.

Keywords: allelopathy, flavonol glycosides, fitotoxins, prospecting of allelochemicals.

Introdução

Produtos naturais que apresentam atividade biológica são as principais fontes de novas estruturas químicas úteis ao desenvolvimento de moléculas com potencial para utilização na farmacologia, agronomia e outros campos do conhecimento humano. Um crescente interesse tem sido focado nos metabólitos secundários, os quais desempenham importante função na comunicação química entre organismos (Macías et al. 2008).

O interesse pelos metabólitos secundários surgiu devido a possibilidade de múltiplos usos dos compostos químicos produzidos nessas vias. Taiz e Zeiger (2009) classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Rice (1984) propôs um agrupamento dos compostos químicos que possuem atividade alelopática 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.

A alelopatia inclui qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos. Nessa definição é importante considerar todas as interações bioquímicas entre os sistemas vivos e o ambiente (IAS 1996).

O estudo da alelopatia tem um forte paralelo com o avanço das técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural (Mallik 2000), especialmente com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A primeira permitiu o isolamento e purificação dos compostos em pequenas quantidades e a segunda, juntamente com a espectrometria de massa e de infravermelho, permitiu a identificação de muitos aleloquímicos conhecidos atualmente (Macías et al. 2008). A identificação dos compostos químicos envolvidos na atividade alelopática das plantas representa importante passo no entendimento do papel ecológico que elas desempenham na dinâmica das plantas nos agrossistemas (Luz et al. 2010); podem ser de interesse acadêmico, não registrados na literatura especializada; intermediários de processos de biossíntese; de importância quimiotaxonômica; e substâncias de interesse econômico, como novos agentes medicamentosos ou novas fontes de compostos raros já utilizados (Matos 1997; Rodrigues et al. 2010).

A prospecção dos metabólitos secundários permite o conhecimento preliminar do comportamento químico dos extratos, sendo um instrumento utilizado na seleção de plantas para estudo (Matos 1997; Rodrigues et al. 2010). Esse conhecimento prévio das classes de componentes químicos encontrados nos vegetais se torna necessário para fornecer a relação dos princípios ativos. Uma vez detectada a presença de determinados grupos químicos, o estudo fitoquímico e biológico pode ser direcionado (Lôbo et al. 2010).

Myrcia tomentosa Glaz. pertence à família Myrtaceae, é uma espécie arbórea, decídua, heliófita, pioneira. Ocorre em mata semidecídua de altitude e em cerrado nos estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Lorenzi 2002). No cerrado *sensu stricto*, esta espécie inibe o desenvolvimento de outras plantas em seu entorno, indicando possível produção de aleloquímicos (pers. obs). Embora esta espécie apresente potencial fitotóxico (Imatomi, não publicado), ainda não há estudos que comprovem a sua atividade ou que caracterizem o seu perfil químico. Assim, nesse trabalho foi testada a hipótese: As folhas de *Myrcia tomentosa* apresentam fitotoxinas promissoras na busca por compostos bioativos.

Para testar esta hipótese foi efetuado isolamento e identificação de compostos baseando-se em bioensaios de germinação de diásporos e crescimento de plântulas de espécies alvo bioindicadoras, bioensaio de coleótilos de trigo e cromatografia de camada delgada.

Material e Métodos

Coleta e beneficiamento do material vegetal

As folhas de *Myrcia tomentosa* Glaz. (Myrtaceae), foram coletadas assistematicamente em 10 indivíduos presentes na reserva de cerrado *sensu stricto* da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). O clima da região, segundo a classificação climática de Köppen é do tipo Cwa (tropical de altitude). As coletas foram efetuadas em setembro de 2009, no final da estação seca. Após a coleta, as folhas foram lavadas durante 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio comercial (0,25%), secas em estufa a 40 °C durante cinco dias e trituradas em moinho industrial elétrico. O pó obtido foi embalado a vácuo e armazenado em ambiente de laboratório (± 25 °C) até a sua utilização no Laboratório de

Alelopatia na Universidade de Cádiz, Espanha, com licença do IBAMA nº 08BR002439/DF.

Extração química

Foi realizada a extração química prévia para verificar a atividade por meio de bioensaios e o rendimento dos extratos. Foram utilizados 10 g de pó de folhas de *Myrcia tomentosa* e 180 mL de cada um dos solventes orgânicos. A extração foi realizada em recipiente de vidro com tampa, no qual se introduziu o pó de folha que foi extraído com 60 mL de solvente orgânico, em ordem crescente de polaridade: hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (ACE), metanol (MeOH) e água (Fig. 3.1). O recipiente foi mantido em banho de ultra-som durante 30 minutos para cada solvente. Decorrido este período, a mistura foi filtrada em funil de Büchner, coberto com papel de poro 0,22 µm e acoplado a uma bomba de vácuo. O extrato obtido foi evaporado em evaporador rotativo. Essa extração se repetiu três vezes para cada solvente (Macías et al. 2010). Assim, os extratos obtidos após a filtração e secagem foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e água (Fig. 3.1).

Após efetuado os bioensaios e obtido os rendimentos, o extrato acetato de etila foi selecionado para a realização do isolamento e identificação de compostos, para tanto, foi extraído 1,5 Kg de pó de folhas, utilizando-se 30 L dos solventes hexano, diclorometano e acetato de etila, seguindo o procedimento supramencionado.

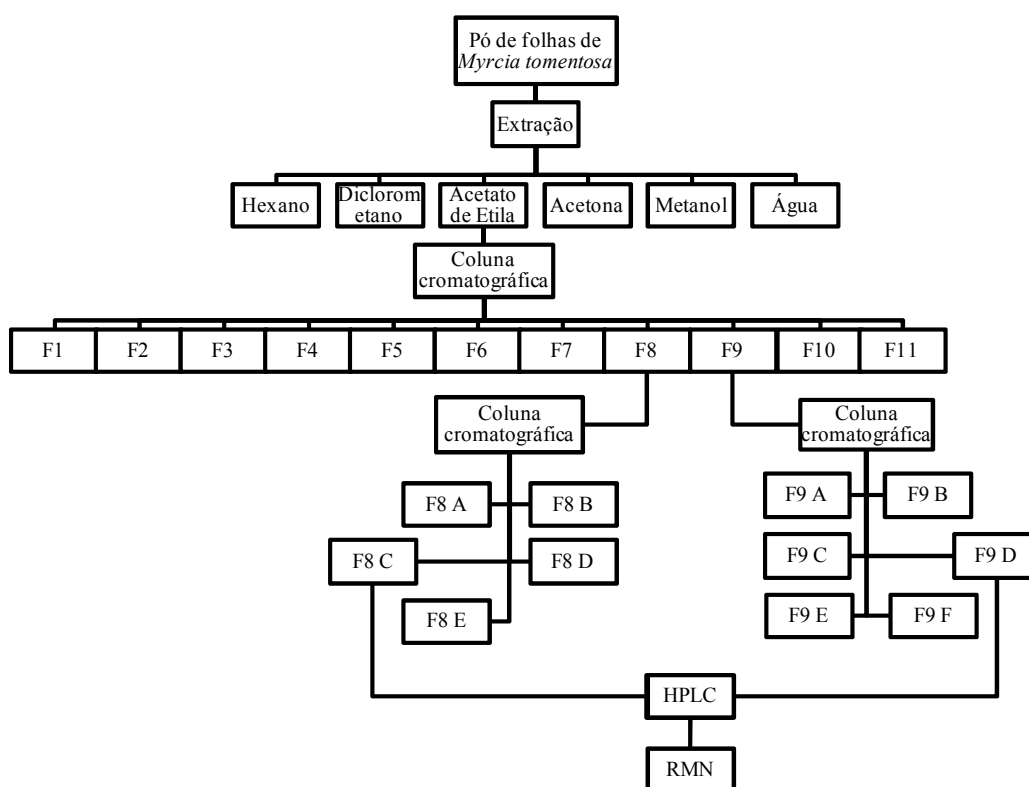


Figura 3.1. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados com o pó das folhas secas de *Myrcia tomentosa*.

Bioensaio de coleótilo de trigo

O bioensaio de coleótilo de trigo quantifica a elongação da zona apical de plúmulas de trigo, crescidas em meio líquido contendo os agentes fitotóxicos. Este ensaio, dada sua sensibilidade, tem sido proposto como passo prévio da avaliação de agentes herbicidas.

Foram utilizados coleótilos estiolados de *Triticum aestivum* L. da variedade Pizon, proveniente de diásporos germinadas e desenvolvidas em placas de Petri cobertas com papel de filtro umedecido com água destilada, as quais foram mantidas em câmara de germinação sob 25 °C na ausência de luz, durante três dias. Decorrido esse período, foram extraídos fragmentos com 2 mm de comprimento a partir do epicótilo, com auxílio da guilhotina de Vander Weij, sob luz verde (Macías et al. 2010).

No bioensaio de coleótilo, foram utilizados 9,7 mg de cada extrato seco, 60 µl de dimetil-sulfoxido (DMSO) para melhor solubilização dos extratos, e 12 mL de solução tampão para obter a diluição de 800 ppm. Em seguida, as diluições para 400 e 200 ppm

foram realizadas. Além dos tubos contendo os diferentes extratos, foram montados três controles, um com solução tampão e DMSO, outro somente com solução tampão e um controle positivo contendo o herbicida LOGRAN[®] (59% de terbutrina e 0,6% de triasulfurona).

Foram utilizados 2 mL de extrato ou soluções do controle em cada tubo de ensaio contendo cinco fragmentos de coleóptilo de trigo (Macías et al. 2010). A solução tampão utilizada era composta de ácidos cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e sacarose (20 g/L), sendo o pH ajustado para 5,6.

Foram utilizados três tubos de ensaio (repetições), contendo cinco fragmentos de coleóptilo para cada extrato avaliado. Os tubos foram dispostos em uma centrífuga, na horizontal, com rotação contínua de 6 rpm. A centrífuga foi mantida em câmara de germinação a 25° C na ausência de luz. Após 24 horas os fragmentos foram retirados, dispostos em uma planilha plastificada e fotografados para serem medidos com auxílio do programa Photomed[®] (Macías et al. 2010).

Bioensaio de diásporos e emergência de plântulas

Neste bioensaio foram utilizados 26 mg de cada extrato seco, 160 µL de dimetil-sulfoxido (DMSO), para melhor solubilização dos extratos, e 32 mL de solução tampão (10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH a pH = 5,6) para obter a concentração de 800 ppm, a qual foi diluída para as concentrações de 400 e 200 ppm. Utilizou-se dois controles, o herbicida comercial LOGRAN[®] (59% de terbutrina e 0,6% de triasulfurona), com atividade conhecida e o controle negativo, que continha somente a solução tampão com DMSO (Macías et al. 2010).

Diásporos de agrião (*Lepidium sativum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) ou cebola (*Allium cepa* L.) foram colocadas em placas de Petri plásticas de 5 cm de diâmetro forradas com papel de filtro e umedecidas com um mL de extrato ou soluções do controle. Estas placas foram mantidas em câmara de germinação a 25 °C na ausência de luz, durante quatro, cinco, seis e sete dias respectivamente. Foram utilizadas quatro repetições de 20 diásporos (n = 80, Macías et al. 2010). O procedimento experimental seguiu o protocolo adotado pelo Grupo de Alelopatia de Cádiz, junto ao qual foi realizado esse trabalho.

Decorridos os tempos específicos para cada diásporo, as plântulas foram retiradas e medidas com auxílio do programa Fitomed. Foram obtidos os valores de comprimentos de raiz e parte aérea e porcentagem de germinação (Macías et al. 2010).

Cálculos matemáticos e análise estatística

Os dados de crescimento dos coleóptilos, porcentagem de germinação dos diásporos, comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas foram calculados em porcentagens de inibição/estímulo em relação ao controle, onde zero indica o mesmo valor do controle, valores positivos indicam estímulo, e valores negativos inibição.

O delineamento experimental, em laboratório, foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnoff). Quando foi constatada a normalidade dos dados, foi aplicada Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância e para os dados não normais foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações binárias, a 1% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico BioEstat 3.0 (Sociedade civil Mamirauá, CNPq).

Fracionamento cromatográfico, purificação e identificação das substâncias

O extrato acetato de etila obtido da extração direta com solvente, selecionado a partir de bioensaio de coleóptilo de trigo e de diásporos, foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica contendo sílica gel Merck (0,06 – 0,2 mm) como fase estacionária, sob pressão atmosférica. Utilizou-se como fase móvel a mescla de eluentes hexano/acetona 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 e 40/60% e acetona 100%. Este procedimento rendeu um total de 76 frações, que foram reunidas, de acordo com observação em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), totalizando 11 frações. Cada cromatoplaça foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com *Oleum* (solução de 10 mL de ácido sulfúrico, 200 mL de ácido acético e 40 mL de água).

Das 11 frações obtidas (Fig. 3.1), foram selecionadas a F8 e F9 para serem submetidas a novo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel, baseando-se na quantidade de material e na atividade da fração, observada em bioensaio de coleóptilo de trigo. Em ambas, foram utilizadas como fase móvel a mescla de eluentes hexano/acetona 40/60, 50/50, 60/40 e 70/30%, acetona 100% e metanol 100%. A fração F8 resultou em

cinco subfrações e a F9 em seis. As subfrações F8C e F9E foram submetidas a fracionamentos posteriores em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na CLAE foi utilizada a coluna semi-preparativa de fase reversa (Merck LiChrospher RP-18, 10 μm , dimensões 250 \times 10 mm) a mistura metanol/água 60/40% foi o eluente utilizado como fase móvel, com fluxo de 3 mL.min⁻¹. A CLAE foi conduzida em um equipamento da marca MERCK HITACHI equipado com canais de detecção L-7490. Os solventes foram impulsionados por bombas de três canais LaChrom L-7100. Os cromatogramas se processaram mediante o software MERCK HITACHI D-7000.

As amostras obtidas nos fracionamentos em CLAE foram submetidas à ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono 13 (RMN¹³C) para identificação das substâncias purificadas (Fig. 3.1). Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram registrados no equipamento VARIAN INOVA 600 e interpretados.

Resultados e Discussão

Extração química

Os extratos aquosos e metanólicos foram os que tiveram maior rendimento, se comparados aos outros extratos, devido à afinidade de polaridade desses solventes com açúcares e produtos glicosilados presentes no pó das folhas. Os extratos provenientes de hexano, acetato de etila e acetona apresentaram rendimento intermediário e o extrato diclorometano apresentou rendimento reduzido em relação aos demais (Fig. 3.2).

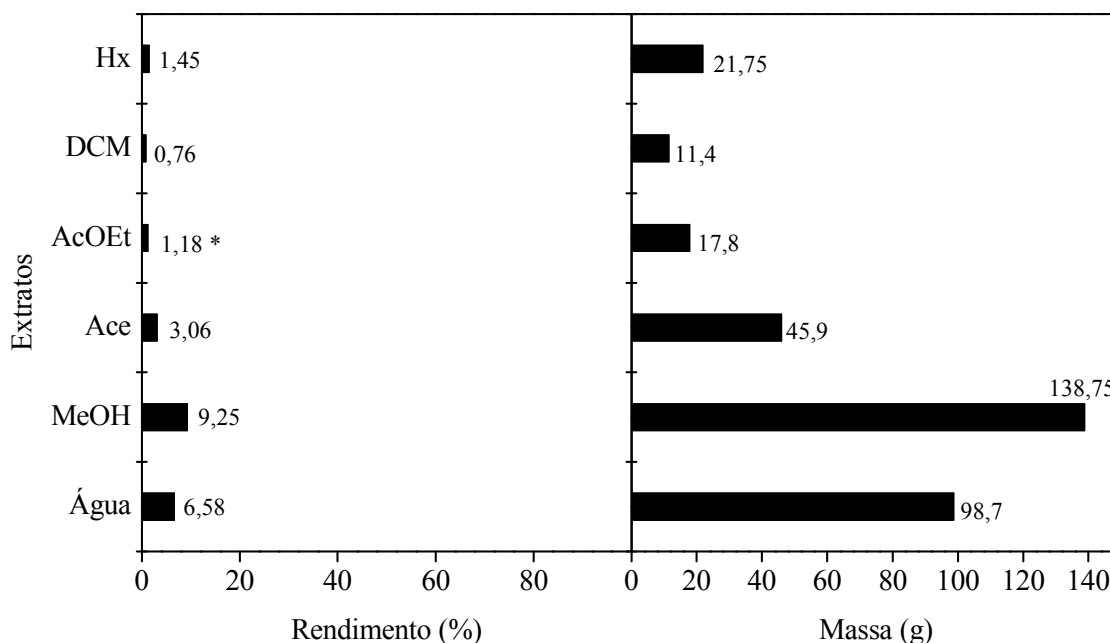


Figura 3.2. Rendimento (%) dos extratos obtidos a partir de 1,5 Kg do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa* na extração com solventes orgânicos: hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (ACE), metanol (MeOH) e água. (*) Extrato selecionado para fracionamento em coluna cromatográfica.

Bioensaio de coleóptilo de trigo com extratos

Os extratos provenientes de hexano, acetato de etila e acetona proporcionaram maior inibição sobre a elongação dos coleóptilos de trigo em todas as concentrações analisadas, numa relação dose-dependente (Fig. 3.3). O extrato diclorometano não apresentou relação dose-dependente convencional, ou seja, a maior inibição observada foi na concentração de 400 e não em 800 ppm, talvez em resposta a dificuldade de solubilidade dos produtos obtidos a partir desse extrato (Fig. 3.3).

Entre os extratos mais ativos, apenas o de acetato de etila manteve os níveis de atividade nas menores concentrações, o que nos indicou que apresentava potencial para ser aplicado satisfatoriamente no prosseguimento do fracionamento, assim este extrato foi selecionado para estudo fitoquímico (Fig. 3.3).

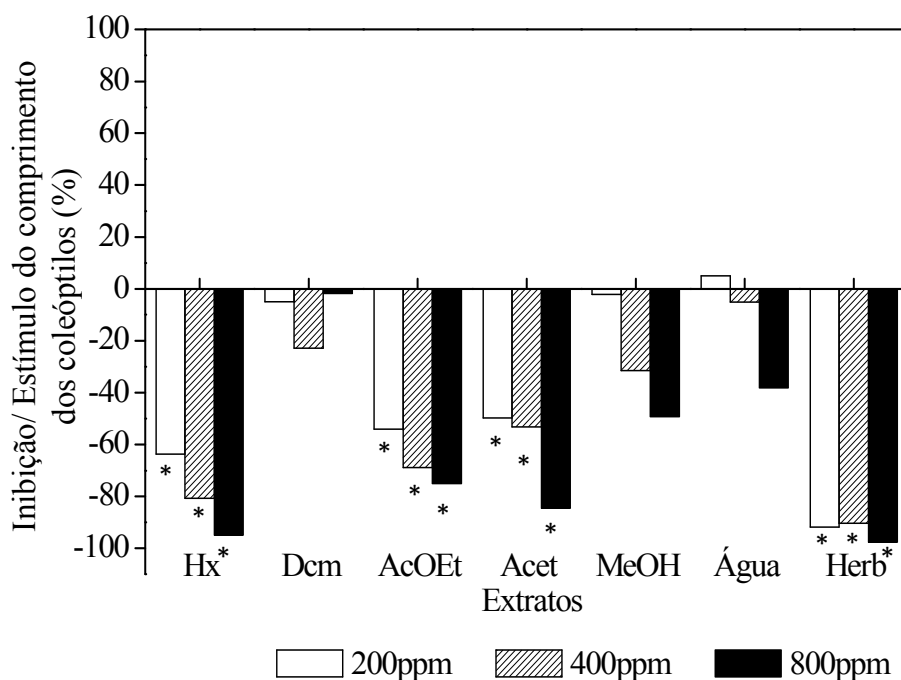


Figura 3.3. Porcentagem de inibição/estímulo, em relação ao controle, do comprimento (mm) de coleóptilos de trigo crescidos durante 24 h a 25°C no escuro, em diferentes extratos obtidos a partir do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa* extraídas com hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (Acet), metanol (MeOH) e, pelo herbicida (Herb). (*) Diferença significativa em relação ao controle.

Bioensaio de diásporos

Os diásporos de alface submetidos aos extratos e ao herbicida, não diferiram estatisticamente do controle. Os diásporos de agrião foram inibidos significativamente por pelo menos uma das concentrações dos extratos oriundos das extrações com diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Os diásporos de tomate tiveram a germinação suprimida significativamente pelo extrato diclorometano e pelo herbicida. O extrato acetona e o herbicida estimularam a germinação de cebola e os demais extratos não apresentaram atividade sobre esta espécie alvo (Fig. 3.4).

Comparando a porcentagem de inibição da germinação das espécies alvo avaliadas, os diásporos de alface e cebola foram os menos sensíveis aos extratos. Parvez et al. (2004) submetem oito espécies de uso agrônomo a extratos de casca e sementes de *Tamarindus indica* L. e, dentre todas as espécies de plantas utilizadas apenas a cebola não foi inibida, confirmando a sensibilidade reduzida desta espécie alvo.

A inibição da germinação dos diásporos por compostos químicos pode ter uma grande função na regulação da sucessão das plantas (Fenner 2000). Respostas distintas obtidas por diferentes espécies receptoras garantem a seletividade das espécies durante o estabelecimento em condições naturais, influenciando a dinâmica das populações. Além disso, o processo de co-evolução das espécies pode ter uma relação com os metabólitos secundários pela habilidade de algumas plantas conseguirem se desintoxicar ou metabolizá-los (Schulz e Wieland 1999; Hofmann et al. 2006).

O comprimento da parte aérea das plântulas de alface foi reduzido significativamente por todos os extratos nas concentrações 200 e 800 ppm e pelo herbicida nas concentrações avaliadas. As plântulas de agrião tiveram o comprimento da parte aérea inibido significativamente pelos extratos provenientes de diclorometano (200 ppm), metanol (800 ppm) e pelo herbicida (200 ppm e 800 ppm). O comprimento da parte aérea das plântulas de cebola foi inibido por todos os extratos e pelo herbicida em pelo menos uma das concentrações. As plântulas de tomate apresentaram redução significativa do comprimento da parte aérea promovida pelo herbicida (Fig. 3.4).

O comprimento das raízes das plântulas de alface e cebola foi inibido por todos os extratos em pelo menos duas das concentrações testadas e pelo herbicida, em todas as concentrações. As raízes das plântulas de tomate tiveram seu comprimento inibido apenas pelo extrato acetona a 200 ppm e pelo herbicida. Todos os extratos estimularam o crescimento das raízes de agrião em pelo menos uma das concentrações e o herbicida inibiu o crescimento das raízes de agrião em todas as concentrações (Fig. 3.4).

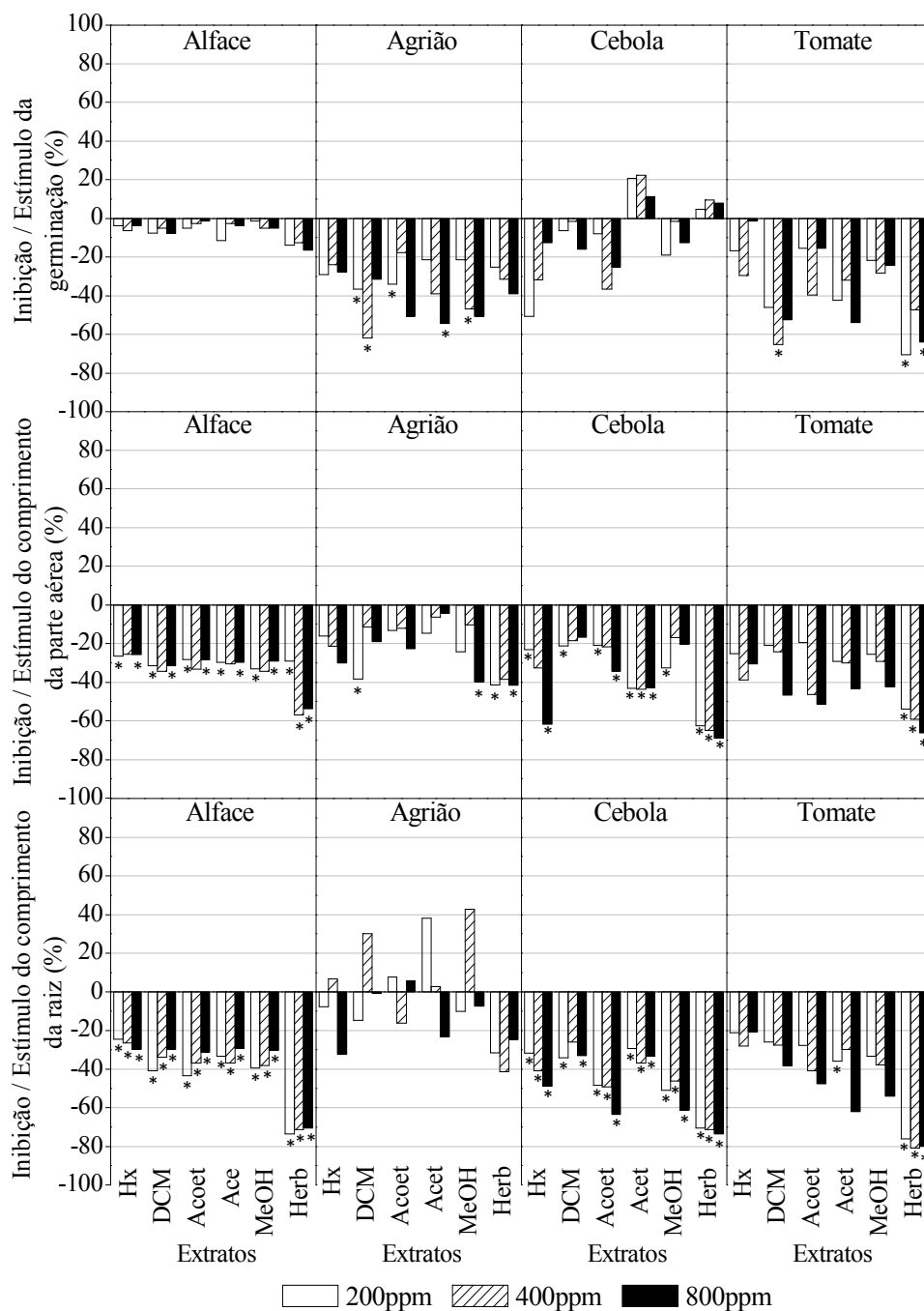


Figura 3.4. Porcentagem de inibição/estímulo do comprimento das plântulas, em relação ao controle, proporcionado pelos extratos obtidos a partir do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*, extraídas com diferentes solventes orgânicos, sobre a germinação de diásporos e comprimento da parte aérea e raiz de plântulas de alfafa, agrião, cebola e tomate mantidas em câmara de germinação a 25 °C no escuro. Hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (Acet), metanol (MeOH) e pelo herbicida (Herb). (*) Indica diferença significativa em relação ao controle.

A resposta do crescimento das plântulas é bastante utilizada para comprovar os efeitos alelopáticos em laboratório, e assim ajudar a conhecer as características fisiológicas e bioquímicas que envolvem os mecanismos de ação alelopática. Os principais efeitos dos aleloquímicos estão relacionados aos processos fisiológicos da planta receptora, podendo agir como inibidores ou promotores da germinação de sementes ou do crescimento (Rice 1984; Fischer et al. 1989, 1990).

Os resultados observados nos bioensaios de diásporos mostraram que as espécies alvo respondem de maneira distinta aos extratos (Fig. 3.4), confirmando que a suscetibilidade das espécies alvo às substâncias fitotóxicas, sob condições de laboratório, depende das características fisiológicas e bioquímicas dessas espécies (Kobayashi 2004), ou seja, a resposta às fitotoxinas é espécie-dependente. A interferência dos extratos sobre a germinação depende do tamanho e estrutura das sementes (Hodgson e Mackey 1986), como a permeabilidade da casca (Hanley e Whiting 2005).

Devido a esta característica, os aleloquímicos são fundamentais tanto em ambientes naturais, influenciando a dinâmica de comunidades, quanto na agricultura, podendo ser utilizado como herbicida seletivo.

Fracionamento

Os resultados descritos acima para o bioensaio de diásporos não foi eficaz em determinar qual extrato proporcionou maior atividade inibitória, todos apresentaram comportamento semelhante. Assim, baseando-se no teste de coleóptilo de trigo, foi possível determinar o extrato a ser fracionado, devido à sua atividade acentuada e à manutenção da atividade nas menores concentrações. Outro aspecto determinante para a escolha foi a pureza e presença de produto majoritário evidente na comparação em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) em placas de sílica. Assim, o extrato acetato de etila foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna.

Na figura 3.5 foi observado que a partir do fracionamento do extrato acetato de etila foram obtidas 11 frações. A fração com maior rendimento foi a F11, resultante da utilização de acetona como eluente para a retirada de parte dos compostos ainda retidos na coluna.

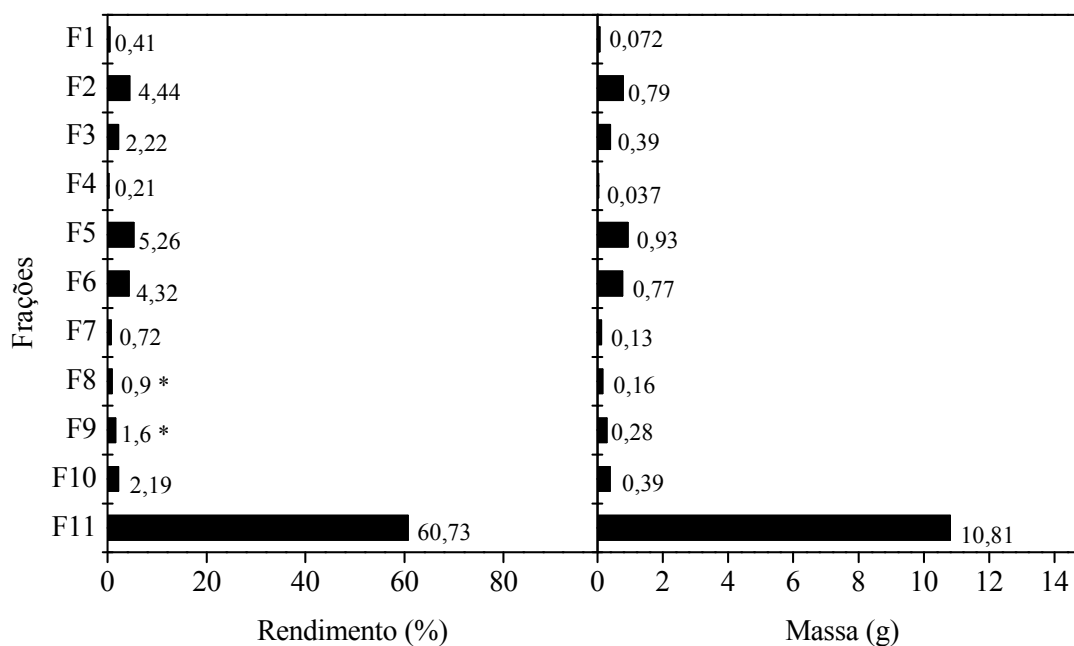


Figura 3.5. Rendimento (%) das frações resultantes do fracionamento em coluna cromatográfica de sílica a partir de 18 g do extrato de acetato de etila adquirido a partir do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*. (*) Frações selecionadas para fracionamento em coluna cromatográfica.

Teste do coleóptilo de trigo com as frações

Para determinar qual a fração com maior potencial em apresentar substâncias com potencial alelopático, foi realizado novamente o teste do coleóptilo, porém apenas duas frações foram testadas devido ao tempo disponível, quantidade e pureza do material. Assim, foram selecionadas as frações F8 e F9 devido a pureza destas, presença de produtos majoritários e quantidade suficiente para dar seqüência ao estudo (acima de 0,1 g) (Fig. 3.6).

Os resultados do teste de coleóptilo para as frações mostram que somente a fração F8 inibiu significativamente o comprimento dos coleóptilos (Fig. 3.6).

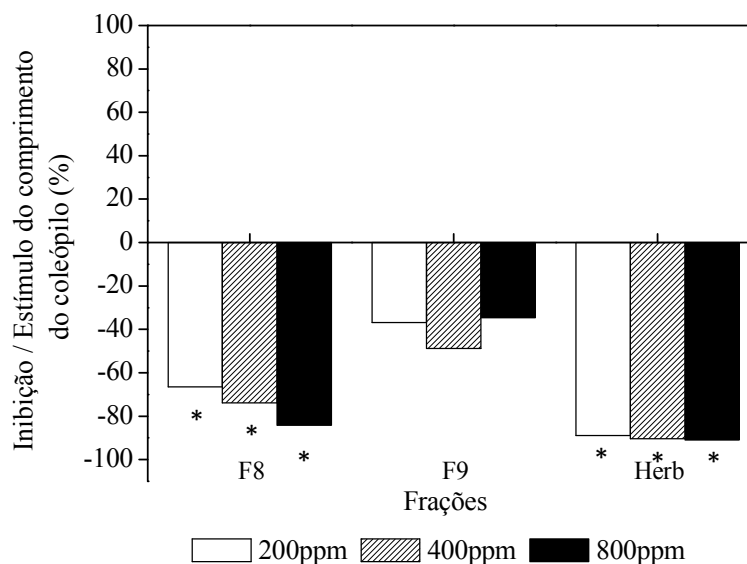


Figura 3.6. Porcentagem de inibição/estímulo, em relação ao controle, das frações F8 e F9, resultantes do fracionamento em coluna cromatográfica de sílica, sobre o crescimento do coleótilo de trigo de 2 mm crescidos durante 24 horas a 25 °C no escuro (Kruskal-Wallis, $p < 1\%$). (*) Diferem significativamente do controle.

Fracionamento e purificação

Foi dada a continuidade ao fracionamento das frações F8 e F9 por meio de fracionamento cromatográfico em coluna, utilizando-se uma coluna mais delgada (3 cm de diâmetro), visando efetivar a purificação dos compostos. Na Figura 3.7 estão demonstrados os rendimentos das subfrações obtidas, a fração F8 foi fracionada em cinco subfrações e a F9 em seis.

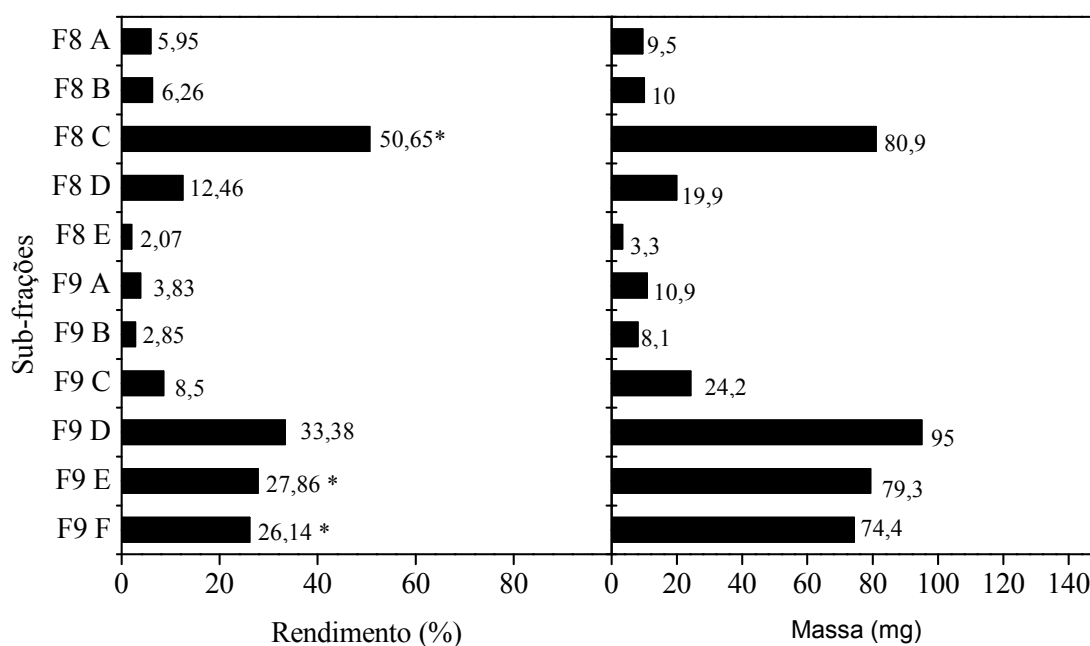


Figura 3.7. Rendimento (%) das subfrações resultantes do segundo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica a partir das frações F8 (m = 159,7 mg) e F9 (m = 284,6 mg) obtidas do primeiro fracionamento realizado a partir do extrato acetato de etila de pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*. (*) Subfrações selecionadas para fracionamento em CLAE.

As subfrações F8C, F9E e F9F, foram submetidas a CLAE que permite a separação mais eficiente das diferentes substâncias de um composto, de acordo com sua polaridade. As subfrações foram purificadas em coluna semi-preparativa de fase reversa (Merck LiChrospher RP-18, 10 μ m, dimensões 250 \times 10 mm) utilizando-se como fase móvel a mescla de eluentes metanol/água 60/40% e como fase estacionária Merck C18. A partir da CLAE obtiveram-se seis produtos F8CI, F9EI, F9EII, F9EIII, F9FI e F9FII (Tab. 3.1).

Tabela 3.1. Produtos obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir das subfrações purificadas do extrato acetato de etila do pó de folhas secas de *Myrcia tomentosa*.

Subfrações	Massa (mg)	Eluente (MeOH/água)	Produtos	Massa (mg)
F8C	80,9	60/40%	F8CI*	13,6
F9E	79,3	60/40%	F9EI*	28,9
			F9EII	36,3
			F9EIII	2,9
F9F	74,4	60/40%	F9FI	18,6
			F9FII	28,9

(*) Produtos submetidos ao RMN¹H

Os produtos F8CI e F9EI foram submetidos ao RMN¹H para identificação das substâncias devido ao grau de pureza elevado. Os dados espectroscópicos dos produtos F8CI e F9EI coincidem com os descritos na bibliografia para os compostos juglanina (Fiorentino et al 2009) e avicularina (Kim et al 1994) respectivamente, os espectros obtidos encontram-se nos anexos I e II. Ambas são classificadas como flavonóides, juglanina pertence ao grupo dos kaempferóis glicosilados e a avicularina pertence ao grupo das quercetinas glicosiladas (Fig. 3.8)

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. O esqueleto de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos. Essa estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquimíco e do ácido mevalônico (Lima 2004, Fig. 3.8). Os flavonóides influenciam no transporte de auxina (Peer e Murphy 2007), na defesa da planta (Treutter 2005), promove interferência alelopática (Bais et al. 2006), incluindo kaempferol, quercetina e naringenina (Macías et al. 2007) e modula os níveis de espécies reativas de oxigênio (Taylor e Grotewold 2005; Bais et al. 2006). Essas alterações na fisiologia vegetal modificam a arquitetura da planta como um todo, em resposta a interferências no crescimento da raiz e da parte aérea, na resposta gravitropica (Buer e Djordjevic 2009), no número de ramificações, flores e na estatura (Buer et al. 2010).

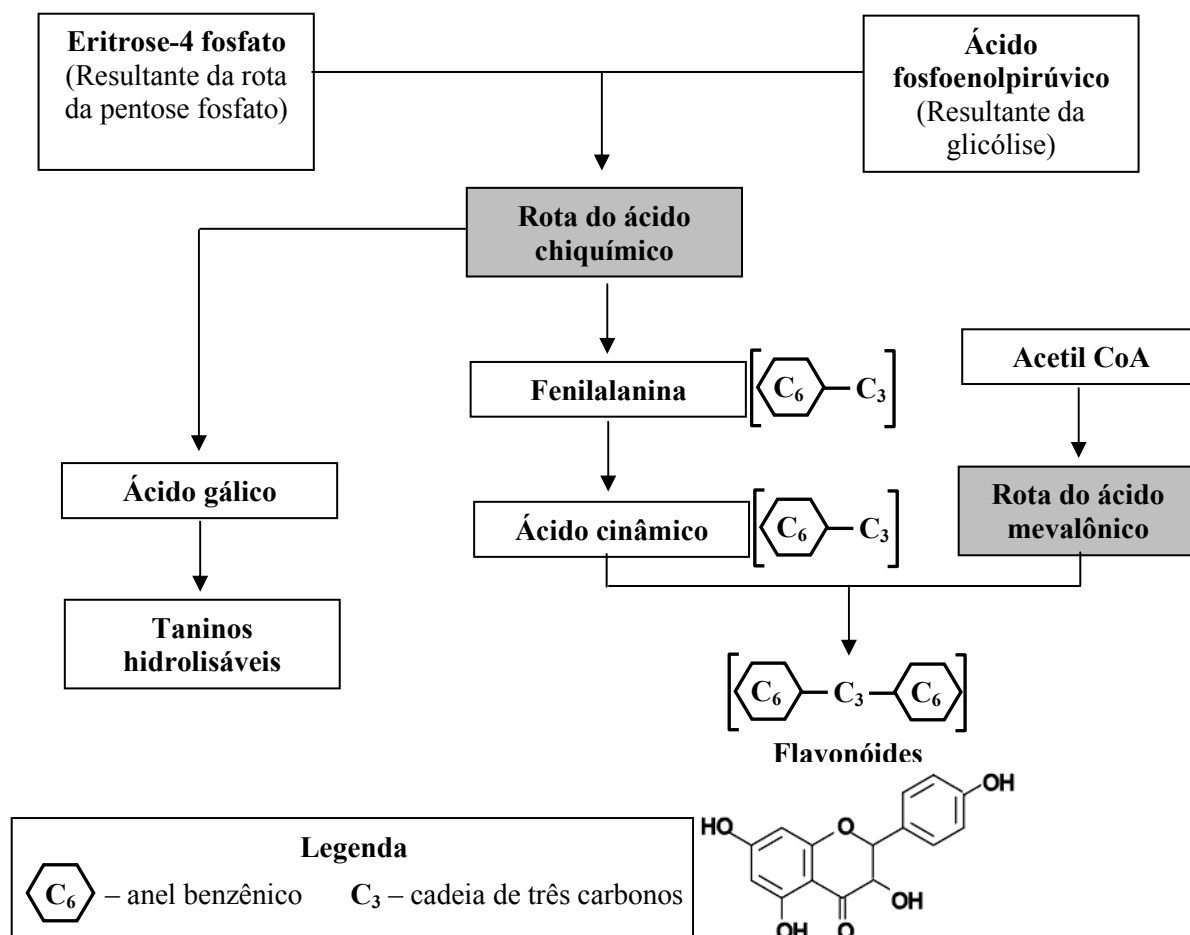


Figura 3.8: Em plantas superiores os flavonóides são derivados da rota do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. As fórmulas entre parênteses indicam o arranjo básico dos esqueletos de carbono (Taiz e Zeiger, 2009 modificado).

Os mecanismos pelos quais alterações nos níveis de flavonóide promovem essas alterações fisiológicas ainda não são bem definidos. São relatados três possíveis mecanismos: 1) efeito direto dos flavonóides sobre a molécula alvo (não identificada); 2) Efeito indireto, mediado pela habilidade dos flavonóides em modular os níveis de auxina; 3) Por meio da regulação de espécies reativas de oxigênio, que estão relacionadas à atividade antioxidante.

Para entender o mecanismo dos flavonóides é necessário entender como ele é transportado pela planta. Diferentes tecidos das plantas são capazes de absorver flavonóides que podem ser transportados para longas distancias em seu interior. Não há uma definição exata do tecido que conduz estes flavonóides, sabe-se que o transporte da

raiz para a parte aérea ocorre via simplasto, e o transporte inverso é limitado aos tecidos vasculares (Buer et al. 2010).

Observando-se os resultados apresentados (Fig. 3.6) da atividade das frações F8 e F9 sobre os coleóptilos de trigo, constatou-se que a fração F8, da qual foi isolada e identificada a molécula juglanina (Fig. 3.9), apresentou maior atividade inibitória quando comparada a fração F9, da qual se isolou e identificou a molécula avicularina (Fig. 3.9). Ambas são compostas pelo mesmo açúcar, um O-glicosídeo (pentose), conjugada ao núcleo aromático kaempferol na juglanina e à quecetina na avicularina. O que as diferencia é a presença de uma hidroxila ligada ao carbono número 3' na molécula de avicularina (Fig. 3.9).

A atividade biológica dos flavonóides está relacionada com sua estrutura química, particularmente com os grupos hidroxil (Cunha et al. 2007). A toxicidade das moléculas está diretamente relacionada à capacidade de se acumular nos tecidos. A avicularina apresenta duas hidroxilas a mais que a juglanina, isto possivelmente lhe confere maior solubilidade, assim esta substância é expelida mais facilmente dos tecidos vegetais, o que a tornaria menos tóxica.

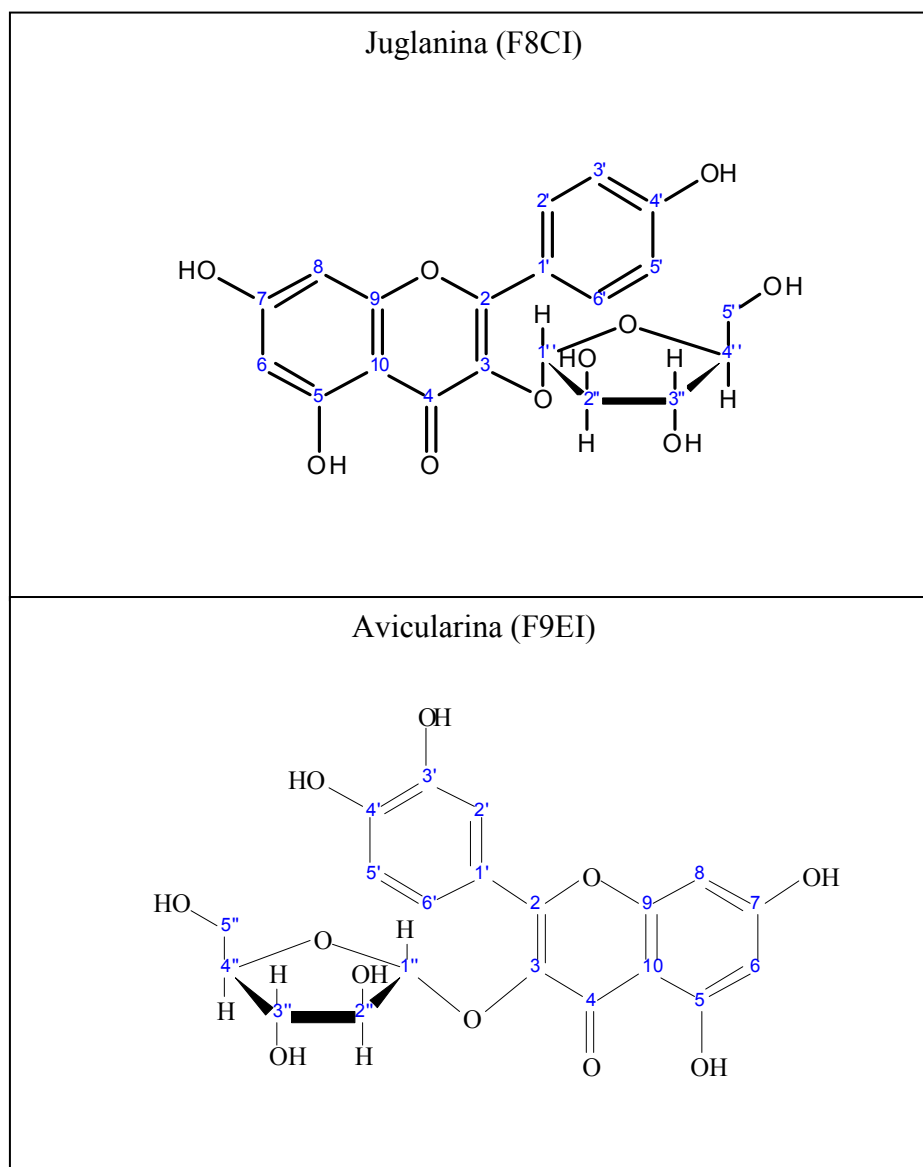


Figura 3.9. Estrutura molecular dos flavonóides glicosilados isolados e identificados em folhas de *Myrcia tomentosa*.

Kaempferol é um flavonóide natural com muitas atividades biológicas associadas (Hong et al. 2009), podendo ser utilizada em produtos comerciais. Um método comercialmente utilizado para preparação do kaempferol foi proposto por hidrólise enzimática usando kaempferol glicosilado extraído de sementes de *Camellia sinensis* (Theaceae, Park et al. 2006).

No presente trabalho foi evidenciada a atividade inibitória do kaempferol, corroborando outros trabalhos nos quais foram utilizadas folhas de *Melilotus neapolitana*

(Fabaceae, Esposito et al. 2008), folhas de *Lobularia maritima* (Brassicaceae, Fiorentino et al 2009), partes aéreas de *Randonia africana* (Resedaceae, Berrehal et al. 2010) e folhas de *Senna alata* (Fabaceae, Rodrigues et al 2010). Poucos trabalhos demonstram a presença de kaempferol na família Myrtaceae, Wollenweber et al. (2000) investigando composição química de folhas de nove espécies de *Callistemon*, duas de *Melaleuca* e uma de *Metrosideros* isolou apenas um kaempferol (6-methyl-kaempferol-3,7-diMe) encontrado em pequenas quantidades em apenas quatro espécies estudadas. Reynertson et al. (2008) isolou e identificou quatro kaempferóis nos frutos de 14 espécies de *Eugenia*, *Myrciaria* e *Syzigium* (dessas apenas uma *Eugenia* é brasileira, porém foi coletada na Flórida-EUA). Witness e Ojewole (2009) relatou a presença de kaempferol em folhas de *Psidium guajava* coletadas em Durban, África do Sul.

No presente trabalho o flavonóide quercetina não apresentou diferença significativa de inibição do crescimento de coleóptilos em relação à outra fração testada (Fig. 3.6), porém a quercetina e seus glicosídeos são considerados agentes alelopáticos e têm sido isolados de várias espécies vegetais (Melos et al. 2007). Foram encontrados alguns trabalhos que demonstram a presença desse flavonóide em outras espécies da família Myrtaceae, mas nenhum deles efetuado com o gênero *Myrcia*. Reynertson et al. (2008) observou a presença de quercetina em 14 frutos de espécies da família Myrtaceae estudadas pertencentes aos gêneros *Myrciaria*, *Syzigium* e *Eugenia* coletados em um parque da Flórida (USA). Análises fitoquímicas revelaram a presença de quercetina em extratos foliares de *Psidium guajava* coletados em Durban, África do Sul (Witness e Ojewole 2009). Quercetina também foi encontrada em cera das folhas de nove espécies de do gênero *Calistemon* e em uma de *Metrosideros* ambas pertencentes a família Myrtaceae. (Wollenweber et al 2000).

O presente trabalho relatou pela primeira vez a presença de kaempferol e quercetina em uma espécie de Myrtaceae do cerrado e deu embasamento para futuros estudos relativos a bioprospecção da espécie *Myrcia tomentosa*.

Referências Bibliográficas

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology** 57: 233-266
- Berrehal D, Khalfallah A, Kabouche A, Kabouche Z, Karioti A, Bilia AR (2010) Flavonoid glycosides from *Randonia Africana* Coss. (Resedaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** doi:10.1016/j.bse.2010.09.019
- Buer CS, Djordjevic MA (2009) Architectural phenotypes in the transparent test a mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany** 60: 751–763.
- Buer CS, Imin N, Djordjevic MA (2010) Flavonoids: News roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology** 53(1): 98-111
- Cunha CRM, Alencar RG, De Oliveira V (2007) Bioconversão: uma alternativa sintética para a produção de derivados funcionalizados na naringina e naringenina. **Revista Eletrônica de Farmácia** 4 (2): 19-22
- Esposito A, Fiorentino A, D'Abrosca B, Izzo A, Cefarelli G, Golino A, Monaco P (2008) Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of Mediterranean herbaceous plant community. **Journal of Plant Interactions** 3(3): 199 – 210
- Fenner M (2000) **Seeds. The ecology of regeneration in plant communities** 2nd ed CABI publishing, New York
- Fiorentino A, Ricci A, D'Abrosca B, Golino A, Izzo A, Pascarella MT, Piccolella S, Esposito A (2009) Kaempferol glycosides form *Lobularia maritima* and their potential role in plant interactions. **Chemistry & Biodiversity** 6: 204-217
- Fischer NH, Weidenhamer JD, Riopel, JL, Quijano L, Menelaou MA (1990) Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. **Phytochemistry** 29(8): 2479-2483.

- Fischer NH, Weidenhamer JD, Bradow J M (1989) Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. **Phytochemistry** 28(9): 2315-2317.
- Hanley ME, Whiting MD (2005) Insecticides and Arable Weeds: Effects on Germination and Seedling Growth. **Ecotoxicology** 14:483–490
- Hodgson JG, Mackey JML (1986) The ecological specialization of dicotyledonous families within a local flora: some factors constraining optimization of seed size. **New Phytologist** 104(3):497-515.
- Hofmann D, Knop M, Hao H, Hennig L, Sicker D, Schulz M. (2006) Glucosides from MBOA and BOA detoxification by *Zea mays* and *Portulaca oleracea*. **Journal of Natural Products** 69:34-7
- Hong JT, Yen JH, Wang L, Lo YH, Chen ZT, Wu MJ (2009) Regulation of hemoxygenase-1 expression and MAPK pathway sin response to kaempferol and rhamnocitrinin PC12cells. **Toxicology and Applied Pharmacology** 237: 59–68.
- International Allelopathy Society (1996) Constitutions. Drawn up during First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future. Cádiz, Spain. <http://www-ias.uca.es/bylaws.htm#CONSTI> (Acessado em 07/10/2010)
- Kim HJ, Woo E-R, Park H (1994) A novel and flavonoids from *Polygonum aviculare*. **Journal of Natural Products** 57(5): 581-586
- Kobayashi K (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management** 4: 1–7.
- Lima MIS (2004). Substâncias do metabolismo secundário de algumas espécies nativas e introduzidas no Brasil. In: Larcher W. *Ecofisiologia Vegetal*. Prado CHBA, Franco, AC (trads). Rima Artes e Textos, São Carlos, 33-40 pp.
- Lôbo KMS, Athayde ACR, Silva AMA, Rodrigues FFG, Lôbo IS, Bezerra DAC, Costa JGM (2010) Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 12 (2): 227-233.

- Lorenzi, H. (2002) **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol. 2, ed. 2. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Luz SM, Souza Filho APS, Guilohn GMSP, Vilhena KSS (2010) Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha** 28(3): 479-487
- Macías FA, Molinillo JMG, Varela RM, Galindo JCG (2007) Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science** 63: 327-348
- Macías FA, Oliveiros-Bastidas A, Marín D, Carrera C, Chinchilla N, Molinillo JMG (2008) Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potencial use as herbicides models. **Phytochemistry Reviews** 7: 179-194
- Macías FA, Lacret R, Varela RM, Nogueiras C, Molinillo JMG (2010) Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology** 36: 396-404
- Mallik, A. (2000). Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview. **Journal of Chemical Ecology** 26: 2007-2009.
- Matos FJA (1997) **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Edições UFC, Fortaleza. 141 p.
- Melos JLR, Silva LB, Peres MTLP, Mapeli AM, Faccenda O, Anjos HH, Torres TG, Tiviroli SC, Batista AL, Almeida FGN, Flauzino NS, Tibana LA, Hess SC, Honda NK (2007) Constituintes químicos e a avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). *Química Nova* 30(2): 292-297.
- Park JS, Rho HS, Kim DE, Chang IS (2006) Enzymatic preparation of kaempferol from Green tea seed and its antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54: 2951–2956.
- Parvez SS, Parvez MM, Fujii Y, Gemma H (2004) Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. **Plant Growth Regulation** 42: 245-252.
- Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science** 12: 556–563.

- Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry** 109: 883-890
- Rice EL (1984) **Allelopathy**. 2^a ed. New York. Academic Press.
- Rodrigues IMC, Souza Filho APS, Ferreira FA, Demuner AJ (2010) Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha** 28 (1): 1-12
- Schulz M, Wieland I (1999) Variation in metabolism of BOA among species in various field communities Biochemical evidence for co-evolutionary processes in plant communities? **Chemoecology** 9:133-141.
- Taiz L, Zeiger E (2009) **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre
- Taylor LP, Grotewold E (2005) Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion Plant Biology** 8:317–323
- Treutter D (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology** 7: 581–591.
- Witness DHC, Ojewole JAO (2009) Spasmolytic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated uterine horns. **Journal of Smooth Muscle Research** 45 (1): 31–38
- Wollenweber E, Wehde R, Dörr M, Lang G, Stevens JF (2000) C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. **Phytochemistry** 55: 965-970

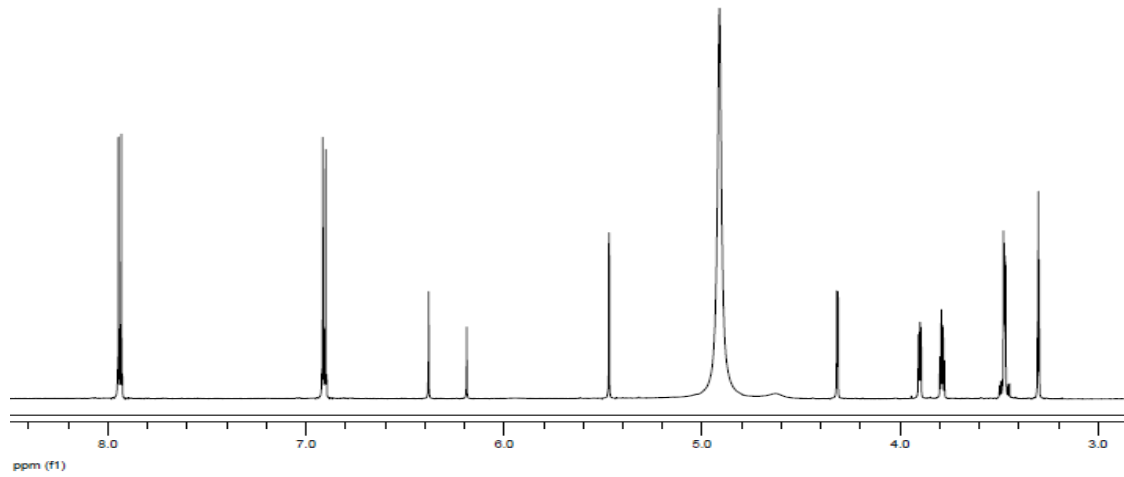
CONCLUSÃO GERAL

Os extratos aquosos de doze das quinze espécies doadoras avaliadas apresentaram atividade alelopática. Cada espécie demonstrou comportamento distinto em relação à atividade alelopática, não houve agrupamento por proximidade taxonômica.

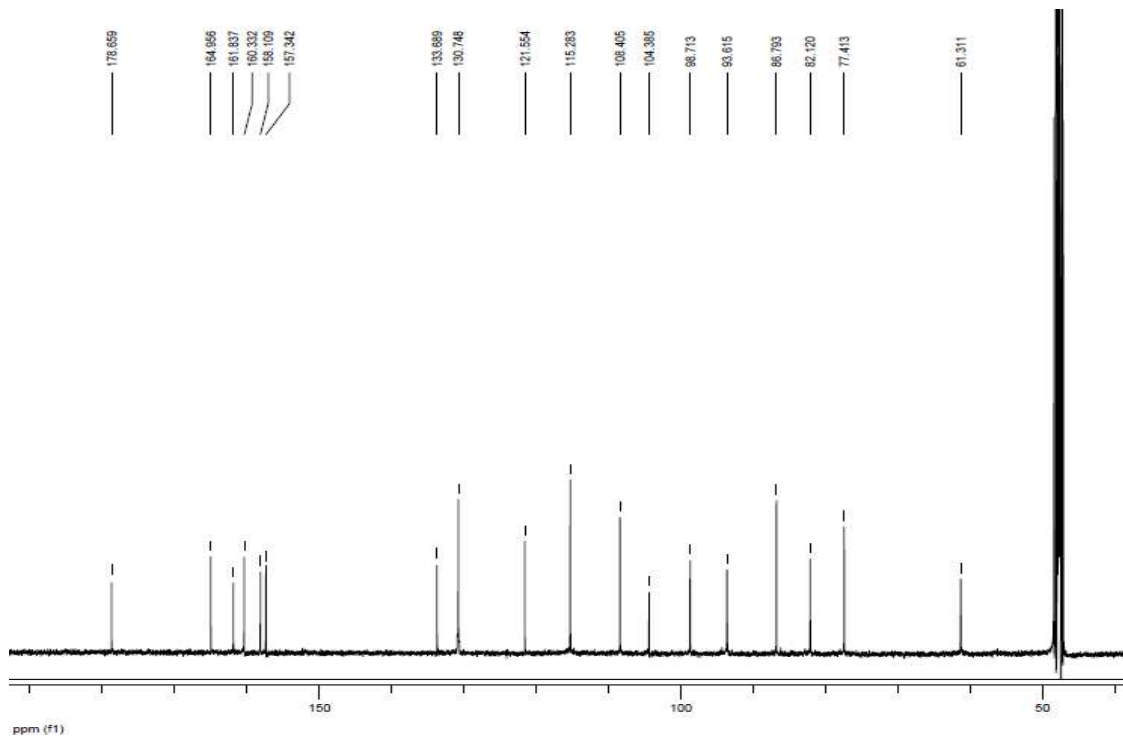
Os extratos aquosos de *Blepharocalyx salicifolius*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens* e *Myrcia tomentosa* foram mais fitotóxicos às espécies invasoras que o herbicida. O extrato foliar de *M. tomentosa* destacou-se por demonstrar elevada atividade mesmo em baixa concentração.

No estudo biodirigido em busca de moléculas bioativas nas folhas de *Myrcia tomentosa* foram isolados dois compostos do extrato acetato de etila: juglanina e avicularina, o que as diferencia é a hidroxila ligada ao carbono 3' na molécula de avicularina, esta diferença produz efeito fitotóxico mais acentuado da molécula de juglanina. O presente trabalho relatou pela primeira vez a presença dos flavonóides kaempferol e quercetina em uma espécie de Myrtaceae do cerrado.

ANEXO I

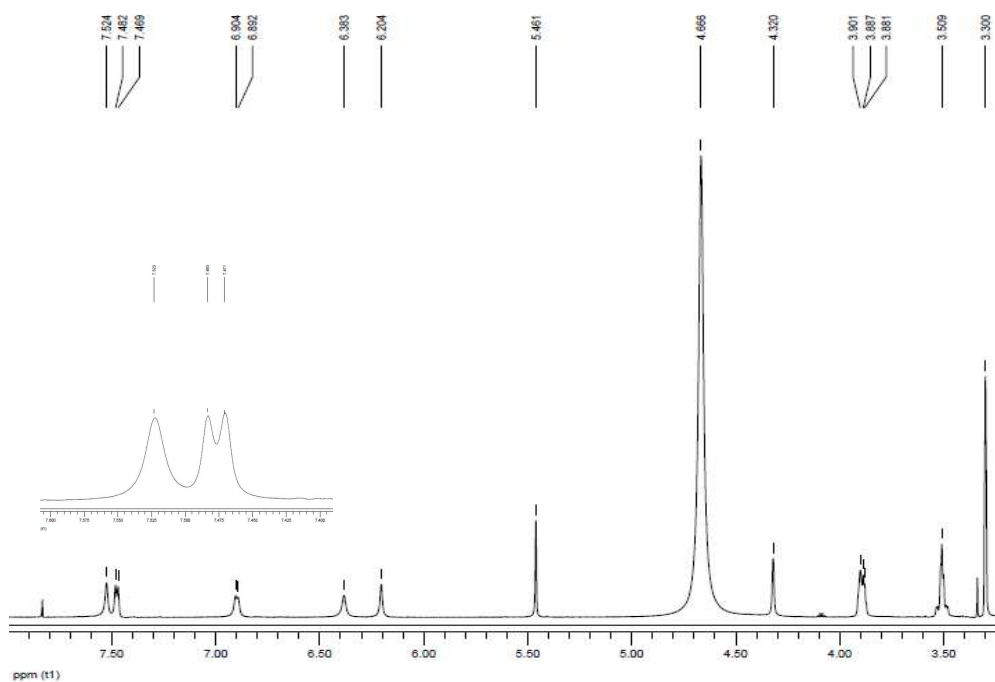
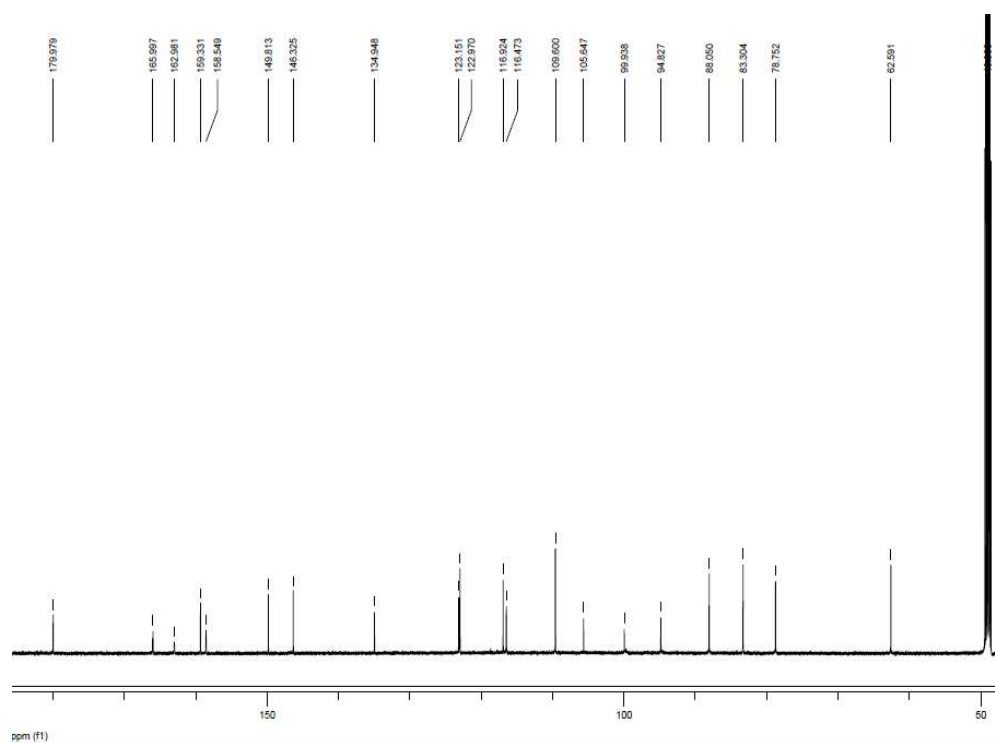


Espectro de RMN¹H (600MHz, CD₃OD, a 25° C) referente à molécula da Juglanina



Espectro de RMN¹³C (150MHz, CD₃OD, a 25° C) referente à molécula da Juglanina

ANEXO II

Espectro de RMN¹H (600MHz, CD₃OD, a 40° C) referente à molécula da avicularinaEspectro de RMN¹³C (150MHz, CDC₃OD, a 40° C) referente à molécula de avicularina