

**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 DO**  
**GÊNERO *SOLANUM* DO DISTRITO FEDERAL**

**Sarah Christina Caldas Oliveira**

São Carlos –S.P.

2009

# **ESTUDO ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *SOLANUM* DO DISTRITO FEDERAL**

Sarah Christina Caldas Oliveira

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez

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.

São Carlos – S.P.

2009

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

O48ea

Oliveira, Sarah Christina Caldas.

Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal / Sarah Christina Caldas Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

163 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Alelopatia. 2. Cerrado. 3. *Solanum*. 4. Fitoquímica. 5. Bioensaios. I. Título.

CDD: 581.23 (20<sup>a</sup>)

Sarah Christina Caldas Oliveira

**ESTUDO ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *SOLANUM* DO  
DISTRITO FEDERAL**

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

Aprovada em 15 de dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Presidente *Sonia Cristina Juliano Gualtieri*  
Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri  
(Orientadora)

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

2º Examinador *Andréia Pereira de Matos*  
Profa. Dra. Andréia Pereira de Matos  
UNICEP/São Carlos-SP

3º Examinador *Silmara Cristina Fanti*  
Profa. Dra. Silmara Cristina Fanti  
UNICEP/São Carlos -SP

4º Examinador *Alfredo Gui Ferreira*  
Prof. Dr. Alfredo Gui Ferreira  
UFRGS/Porto Alegre-RS

Homologado(a) pela CPG  
419<sup>o</sup> reunião 17/12/09  
CPG - ERN/UFSCar

*“Feliz o homem que acha sabedoria e adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela.”*

Provérbios 3:13-14

Dedico esse trabalho:

Ao meu marido Carlos por toda força e amor  
Aos meus maiores projetos: Júlia e Marina  
À minha mãe pelo exemplo de amor e luta  
Aos meus irmãos: Adalberto, Pedro e Paulo

*In memoriam* ao meu Pai ...

## AGRADECIMENTOS

Puxa, essa é a parte mais difícil de escrever da tese. Faz nosso coração pensar em lembranças de 4 anos de vida, e como a vida muda nesse intervalo de tempo. Estando grávida é uma tarefa mais difícil por dois motivos: primeiro porque todos os neurônios disponíveis já foram usados nas páginas a seguir (grávida fica um pouco lerda) e, segundo, porque a emoção está a flor da pele (choro por qualquer coisa). Mas vamos lá.

A presença de Deus é muito forte na minha vida, e toda a luz do meu caminho é iluminado por Ele. Sem a sua presença não teria dado o primeiro passo para tentar dá esse último. Obrigada Senhor por todas as bênçãos!

A professora Sônia Cristina J. G. de A. Perez por ter aceitado e confiado em mim na orientação à distância e de irmos juntas para Espanha. Agradeço a atenção, as preocupações e o carinho de todo coração.

Ao meu marido Carlos que sem sua força, seu amor, sua paciência, seu incentivo não teria conseguido nada do que está aqui. Das viagens para São Carlos com uma filha pequena, da nossa mudança para Espanha, de todas as correções da tese, por tudo... por tudo que você é pra mim, meu muito obrigada meu amor.

Aos meus dois projetos mais importantes da vida agradeço. A Júlia por ter feito seu primeiro ano de vida e o quinto em São Carlos, graças à tese. Por ter me acompanhado sempre e por eu ter ficado ausente. A Marina, que durante o seu desenvolvimento, esteve comigo todos os dias me lembrando que ela era minha força de seguir e dos estresses sofrido nesse período. Desculpas e obrigado filhas!

A minha mãe agradeço também as viagens para São Carlos e por ter cuidado da Júlia pra mim até na Espanha. Por ter me ensinado tudo de bom que sei na vida e por ter me incentivado, desde muito pequena, aos estudos acreditando que esse me daria um futuro melhor. Por seu amor, por ter me ensinado a lutar por meus sonhos e acima de tudo não desistir deles. Obrigada mãe e sua presença é maravilhosa pra mim!!

“Começar é a metade da caminhada”. Essa frase do meu irmão Adalberto sempre significou muito pra mim. Sua presença carinhosa e amiga sempre foi meu porto seguro, lembra quando bati o carro em São Carlos? Obrigada neném por tudo! E minha querida cunhadinha, Andreíza, que tem trazido alegria para meu irmão e para toda nossa família. Aos meus irmãos Pedro e Paulo, que mesmos distantes, sempre tiveram um carinho por mim e eu por eles e agora, mais do que nunca, seguimos unidos como família.

A minha grande família, que agora um pouco espalhada, mas sempre junta no meu coração....aos meus primos-irmãos Cris, Carlo, Manu, Yuri, Jú, Thyzara e Pedro por serem tudo de bom pra mim, tudo mesmo. Ao tio Ruy por toda a força e incentivo e

a tia Linda (*in memória*) de quem tenho imensa saudade e que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditava. Amo todos vocês!!

A minha sogra Regina e meu sogro Matheus por serem pessoas muito presentes e por me quererem bem como filha. Por cuidarem da Júlia pra mim e por serem grandes incentivadores das nossas conquistas. Os meus cunhados também pelos bons momentos vividos juntos. A tia Adriana, tio Júlio e tia Léo, obrigada pela força!

A família Universidad de Cádiz que me proporcionaram grandes experiências e emoções nessa vida. A orientação do Macías, Chema, Rosa, José Luiz, Juan Carlos, Chon, Anita, Núria, Cefe, Elena, Loli, Pablo e todos do laboratório de alelopatía, a Aourell que me fez rir muito. E aos brasilienses Warley, Silmara, Paula, Maristela, Helena e Luiz Fernando e as meninas que forma nossos amigos do peito, e que ficaram de herança maravilhosa dessa experiência fantástica da minha vida. Obrigada de coração!

À família Universidade Católica de Brasília onde comecei todo o trabalho de tese e sem apoio da Débora e do Marcelo não teria feito muita coisa, obrigada meninas. Os técnicos fantásticos como a Valéria, Wilson (tritador de folhas) e Kamilla e os grandes amigos do laboratório de Botânica: Cássia (super-poderosa), Eduardo, Melina, José Geraldo, Bárbara e minha chefe Lourdes. A todos obrigada por tudo!

À família Rede de Sementes do Cerrado que na minha ausência levou os trabalhos e continuou essa nobre missão: Magaly, Manoel Claudio, Ana Palmira, Carmem, Bruno e voluntários (Ione, Gorette, Jacson, Kumiko).

À família Termobiologia, que o “bom filho” a casa retorna. As meninas Layse, Laisa, Estela, Bruna, por me fazerem sentir a emoção da alelopatia de novo e a confiança e amizade do Fabian.

Aos membros da banca, meu muito obrigado por terem aceitado o convite e pelas brilhantes contribuições a esse trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro com a bolsa sanduíche para Espanha.

A Universidade Católica de Brasília por ter fornecido a estrutura e as dispensas de trabalho para realização dos créditos em São Carlos.

E agradeço ao meu pai (*in memória*) por ter me dado a vida, por ter me ensinado a trabalhar e lutar. A sua ausência me ensinou e ensina a ser diferente como pessoa.

Enfim, sou grata a todos que torceram por mim (que por falta de neurônios disponíveis eu não tenha lembrado de apontar aqui) em todas as fases da minha vida... meu muito obrigada!

## RESUMO

O efeito alelopático é diretamente influenciado pelos fatores ambientais e genéticos. Em situação de estresse, a produção dos aleloquímicos pode ser alterada. O estágio de desenvolvimento da planta doadora também afeta esse efeito. Bioensaio é uma ferramenta importante no estudo da alelopatia e serve de orientação no isolamento dos produtos fitotóxicos presentes em extratos de planta. O gênero *Solanum* apresenta 22 espécies descritas no Distrito Federal e muitas dessas apresentam propriedades medicinais e alelopáticas conhecidas. Com isso, esse trabalho objetivou-se em analisar a atividade alelopática de extrato aquoso de folhas de três espécies de *Solanum* (*S. lycocarpum*, *S. subumbellatum* e *S. granuloso-leprosum*) coletadas em duas estações, seca e chuvosa de 10 diferentes matrizes além de estudos fitotóxicos a partir de isolamento biodirigido de extratos orgânicos de folhas de *S. granuloso-leprosum* e *S. lycocarpum*. Os bioensaios para avaliação do efeito da sazonalidade e da idade das folhas (jovens e adultas) foram realizados na germinação e crescimento do gergelim em condições de laboratório. Já os bioensaios para os testes de isolamento biodirigido foram realizados com coleóptilo estiolado de trigo e com sementes de espécies cultivadas como agrião, cebola, alface e tomate. Dentro dos parâmetros avaliados, a germinação sofreu maior influência no tempo médio, causada por extratos de folhas adultas, e a germinabilidade, causada por extratos de folhas jovens, e o período chuvoso mostrou maior efeito. Já no crescimento, a parte radicular foi a mais afetada pela presença dos extratos de folhas jovens coletadas na época da seca. A época de seca foi onde, na maioria dos casos, observou-se maior efeito inibitório e as folhas jovens mostrando uma maior produção de compostos secundários. Os extratos das folhas de *S. granuloso-leprosum* e *S. lycocarpum* foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel e purificados em CLAE e seus produtos identificados em RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Foram isolados o carotenóide luteína e também uma lactona sequiterpênica chamada loliolida das folhas de *S. granuloso-leprosum* e 6 compostos dos extratos das folhas de *S. lycocarpum* sendo estes: estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina, oleato glicerol, ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico. A atividade alelopática desses compostos foi discutida conforme dados da literatura e ainda não haviam sido descritos a presença desses produtos nessas espécies.

Palavras chave: alelopatia, Cerrado, *Solanum*, fitoquímica, bioensaio

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RMN<sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Tmed – Tempo médio de germinação

G% - Germinabilidade

Hx - Hexano

DCM – Diclorometano

AcOEt – Acetato de etila

MeOH – Metanol

rpm – rotações por minuto

μL – microlitro

mL - mililitro

μm - micometro

M – Molaridade

mg - miligrama

ppm – parte por milhão

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

---

Figura 1. Agentes alelopáticos mais representativos segundo modelo proposto por Rice (1984). Rotas biossintéticas.

Figura 2. Mecanismos de liberação de substâncias aleloquímicas (Sánchez 2002).

Figura 3 – Distribuição espacial dos Biomas do Brasil (escala 1:5.000.000, IBGE, 2004).

### CAPÍTULO 1

---

Figura 1.1. Precipitação pluviométrica média mensal dos anos de 2006 e 2007 da região de Brasília. As setas indicam os meses de coleta na época de seca (seta escura) e época de chuva (seta clara). Fonte: INMET

Figura 2.1. Flores e frutos de *S. lycocarpum*

Figura 3.1. Flores e arbusto de *S. subumbellatum*

Figura 4.1. Frutos e arbusto de *S. granuloso-leprosum*

Figura 5.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes de *S. lycocarpum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 6.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. lycocarpum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 7.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 matrizes de *S. subumbellatum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 8.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. subumbellatum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 9.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim, tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 matrizes de *S. granuloso-leprosum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 10.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. granuloso-leprosum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 11.1. Resumo da atividade alelopática inibitória das três espécies de *Solanum* na germinabilidade (G%) e tempo médio (Tmed) das sementes de gergelim, tratadas com extrato de diferentes tipos de folha (jovem e adulta), coletadas em duas épocas do ano (seca e chuva). Áreas coloridas significam maior inibição dos tratamentos em relação ao controle.

Figura 12.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. lycocarpum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 13.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. subumbellatum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 14.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. granuloso-leprosum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 15.1. Plântulas de gergelim com 7 dias de crescimento, expostas a extrato aquoso de folhas jovens *S. granuloso-leprosum* a 5% (p/v) (A); e o controle crescendo em água destilada (B). Presença de necroses nas plântulas tratadas com extrato e redução do crescimento da radícula.

Figura 16.1. Resumo da atividade alelopática inibitória das três espécies de *Solanum* no crescimento da parte aérea (PA) e parte radicular (PR) das plântulas de gergelim, tratadas com extrato de diferentes tipos de folha (jovem e adulta), coletadas em duas épocas do ano (seca e chuva). Áreas coloridas significam maior inibição dos tratamentos em relação ao controle.

## CAPÍTULO 2

---

Figura 1.2. Fluxograma mostrando as etapas de preparação dos extratos diclorometânico e metanólico das quatro espécies de *Solanum* avaliadas.

Figura 2.2. Fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo após 24h de bioensaio. (A) efeito do herbicida comercial Logran<sup>®</sup> no desenvolvimento dos coleóptilos e (B) o controle que cresceu somente com solução tampão e (C) o rotor onde eram dispostos os tubos com os fragmentos de coleóptilo.

Figura 3.2. Extrato de folhas adultas (SGA) e jovens (SGJ) de *Solanum granuloso-leprosum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Figura 4.2. Extrato de folhas adultas (SSA) e jovens (SSJ) de *Solanum subumbellatum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Figura 5.2. Extrato de folhas adultas (SPA) e jovens (SPJ) de *Solanum paniculatum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Figura 6.2. Extrato de folhas adultas (SLA) e jovens (SLJ) de *Solanum lycocarpum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Figura 7.2. Atividade alelopática das frações do extrato de diclorometano do pó da folha de *S. granuloso-leprosum*, no desenvolvimento dos coleóptilos estiolados de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Figura 8.2. Fluxograma mostrando o rendimento das frações do extrato de diclorometano das folhas de *S. granuloso-leprosum*, bem como as frações eleitas para serem purificadas.

Figura 9.2. Composto isolado das frações F3 e F4 do extrato de diclorometano do pó das folhas de *S. granuloso-leprosum*- o carotenóide Luteína (P1)

Figura 10.2. Produto extraído da fração F6 do extrato de diclorometano do pó das folhas de *S. granuloso-leprosum*- a loliolida (P2).

### CAPITULO 3

---

Figura 1.3. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados com o pó da folha de *S. lycocarpum*.

Figura 2.3. Inibição dos coleóptilos com o uso do herbicida comercial Logran<sup>®</sup> (A) em comparação com controle (B).

Figura 3.3. Rendimento em % dos extratos do pó das folhas de *S. lycocarpum*. Fracionamento líquido-líquido de acetato de etila -AcOEt (líq-líq)- e diclorometano - DCM (líq-líq); extrações diretamente das folhas aquoso, metanol (MeOH), Acetona (ACE) Acetato de etila (AcOEt), Diclorometano (DCM) e Hexano.

Figura 4.3. Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum*), durante 24 horas de crescimento no escuro, em contato com diferentes extratos e frações de folhas de *S. lycocarpum*. Fracionamento líquido-líquido de acetato de etila -AcOEt (líq-líq)- e diclorometano -DCM (líq-líq); extrações diretamente das folhas: aquoso, metanol (MeOH), Acetona (ACE) Acetato de etila (AcOEt), Diclorometano (DCM) e Hexano (Hx).

Figura 5.3. Inibição da germinação de sementes agrião (*Lepidium sativum* L) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante 4 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 6.3. Inibição da germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*), durante 5 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 7.3. Inibição da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante 6 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 8.3. Inibição da germinação de sementes de cebola (*Allium cepa* L), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*), durante 7 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 9.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de agrião, crescidas durante quatro dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 10.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de tomate, crescidas durante cinco dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 11.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de alface, crescidas durante seis dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 12.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de cebola, crescidas durante sete dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle

Figura 13.3. Produtos isolados do extrato de diclorometano de folhas jovens de lobeira.

Figura 14.3. Produtos isolados do extrato de acetona (P11 e P15) e do extrato de diclorometano (P13) de folhas jovens de lobeira.

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

---

Tabela 1.2. Rendimento dos extratos diclorometânico e metanólico extraídos do pó da folha de quatro espécies do gênero *Solanum* com diferentes idades (jovens e adultas).

### CAPÍTULO 3

---

Tabela 1.3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de diclorometano das folhas jovens de *S. lycocarpum*.

Tabela 2.3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de acetona das folhas jovens de *S. lycocarpum*.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS -----	i
RESUMO -----	iii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS -----	iv
ÍNDICE DE FIGURAS -----	v
ÍNDICE DE TABELAS -----	x
INTRODUÇÃO -----	1
Objetivos gerais _____	11
Objetivos específicos _____	11
Referências bibliográficas _____	11
CAPÍTULO 1 – “Efeito de diferentes matrizes, sazonalidade e idade das folhas de três espécies de <i>Solanum</i> do DF”. -----	18
Introdução _____	20
Material e métodos _____	22
Resultados e Discussão _____	26
Conclusões _____	47
Referências Bibliográficas _____	48

CAPÍTULO 2 – “Isolamento biodirigido de compostos alelopático de folhas de espécies de <i>solanum</i> (Solanaceae)”	54
---	----

Introdução	56
Material e métodos	58
Resultados e Discussão	62
Conclusões	74
Referências Bibliográficas	74
ANEXO I	80
ANEXO II	88
ANEXO III	96

CAPÍTULO 3 – “Estudo fitotóxico de extratos de folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hil.”	99
---	----

Introdução	101
Material e métodos	103
Resultados e Discussão	109
Conclusões	134
Referências Bibliográficas	134
ANEXO	144

CONCLUSÕES GERAIS	160
-------------------	-----

## INTRODUÇÃO

Uma característica notável da maioria das plantas terrestres é que em seu estado adulto são sedentárias. Mesmo que algumas espécies podem desenvolver-se vegetativamente em diferentes direções desde seu lugar de alcance, a maioria permanece no mesmo lugar de sua germinação. Este sedentarismo tem um profundo impacto na história de vida dos indivíduos, causando uma influencia na sua ecologia e evolução de uma população inteira (Oliveiro-Batidas 2008).

Esta característica de um movimento restringido das plantas tem sido compensada evolutivamente com outros mecanismos de defesa, subdivididos em mecânicos, fenológicos e químicos. Entre os mecânicos encontramos a formação de espinhos, aumento da dureza de suas folhas mediante uma maior deposição de sílica e presença de tricomas entre outros; nos quais afetam a morfologia da planta. Entre as defesas fenológicas, encontra-se, por exemplo, o chamado “escape fenológico” que ajusta o ciclo de biológico das plantas para evitar condições de estresse. Por último, a defesa química (constitutiva ou induzida) estão representadas por aqueles compostos de origem secundária que atuam em detrimento de um estresse ocasionado em uma planta como, por exemplo, herbivoria, afídeos ou patógenos (Oliveiros-Bastidas 2008).

Todos eles, de maneira individual, aditivas ou sinérgicas, tem proporcionado as plantas uma excelente capacidade adaptativa ocupando os mais variados nichos ecológicos. A defesa química são metabólitos secundários, responsáveis pela transmissão de informações de uma planta com seu entorno, e incluem as interações planta-planta, planta-inseto, planta-microorganismos (Harbone 1997).

Dependendo do tipo de interação ou informação a transmitir, muitos desses metabólitos são sintetizados desde os primeiros estágios de crescimento (defesa constitutiva), como no caso de interações planta-planta de uma mesma espécie, ou ao contrário, estes podem ser sintetizados por estímulos externos, como a presença de herbívoros, que se traduzem em um “alarme metabólico” que disparam suas rotas biossintéticas (defesa induzida) (Tallamy & Raupp 1991).

Os produtos naturais têm sido usados desde a antiguidade com numerosas aplicações, como remédios, pigmentos e essências. Todavia, essa área veio a ter sua

importância no século XIX, onde seus estudos ganharam força e é uma área forte dentro da química orgânica. O desenvolvimento de novos e mais potentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas também foram chave para o avanço nos estudos (Macías *et al.* 2007).

As primeiras evidências, de caráter intuitivo, da interação química entre plantas datam a mais de dois mil anos (Rice 1984), com as observações de outros como Teofrasto (370-285 a.C.), Virgílio (70-19 a.C.) e Plínio “o velho” (23-79 a.C.), os quais, nos primeiros tratados sobre agricultura que se conhece, recorrem a idéia da existência de “interações maléficas” entre os vegetais. No livro “*The History of Allelopathy*” (a história da alelopatia) há relatos de efeito alelopáticos antigos nos mais diversos locais do mundo como Grécia, Roma, China, Japão e Índia e o seu papel na agricultura dessas regiões (Willis 2007).

Durante os séculos posteriores não se produziu muitos avanços significativos enquanto a descoberta dos mecanismos que operam nestas interações. Desta forma, durante os séculos XV e XVI se obtém evidências da participação de exudados de raiz na chamada “enfermidade do solo”. Neste sentido, destacam autores como Otto Brunfels, Leonhart Fuchs e, sobre todos, Augusto De Candolle (Rice 1984).

A falta de uma metodologia bem estabelecida e, sobre tudo, de resultados experimentais concludentes, prejudicaram notavelmente a consolidação dessa idéia, os quais não foram retomados até o século XX, onde, definitivamente a alelopatia adquire um caráter científico. A primeira definição do termo alelopatia foi proposta por Molish em 1937 (Willis 2007), como a ciência que estuda as “interações bioquímicas entre todo tipo de plantas, incluindo microorganismos”. Esta definição contemplava efeitos tanto estimulatórios como inibitórios. O significado etimológico do termo alelopatia vem do grego “*allelo*” (mútuo) e “*pathos*” (prejuízo) e tem provocado, historicamente, uma tendência a considerar os efeitos prejudiciais (Sánchez 2002). A definição mais ampla proposta pela Sociedade Internacional, de Alelopatia em 1996, define alelopatia como: “qualquer processo que envolve metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influem no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas” (IAS 1996).

Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são produtos secundários produzidos pelas plantas e são chamados de aleloquímicos, substâncias

alelopáticas, fitotoxinas ou apenas metabolitos secundários. Seus efeitos podem ser intra e interespecíficos e podem proporcionar vantagem tanto ao produtor (doador) como a receptor. Existem relatos de compostos aleloquímicos em todas as partes das plantas como raízes (Tsanuo *et al.* 2003; Viles & Reese 1996), caules (Gatti *et al.* 2004; Smith 1990), folhas (Oliveira *et al.* 2004b, Oliveira & Campos 2006), flores (Ballester *et al.* 1982; Tefera 2002), frutos (Nogushi & Tanaka 2004; Oliveira *et al.* 2004b), sementes (Noor *et al.* 1995) e até mesmo no pólen (Murphy 2000). Para Friedman (1995) todos os órgãos da planta têm potencial para armazenar aleloquímicos, mas a quantidade e o caminho pelos quais são emitidos difere de espécie para espécie.

Além disso, é conhecido que vários estresses podem aumentar a produção pela planta de aleloquímicos fitotóxicos. Por exemplo, o papel da limitação de nutrientes onde a competição por nutrientes pode resultar numa interação alelopática uma vez que o aumento da produção de aleloquímicos pode inibir uma futura competição por recurso (Blum 1999; Humphry *et al.* 2001).

As plantas interagem com sua vizinhança por vários caminhos e estas podem competir com uma com as outras por recursos como nutrientes, água, luz e polinizadores (fontes de competição). Elas também podem produzir substâncias químicas que inibem ou estimulem a germinação ou crescimento, ou indiretamente afetando o crescimento da vizinhança inibindo ou estimulando micorrizas ou bactérias simbiontes como *Rhizobium* (alelopatia). A emissão de químicos voláteis em resposta a herbivoria pode ser detectado pelas plantas vizinhas, induzindo mudanças na sua defesa química. E por fim, plantas podem alojar patógenos e herbívoros ou modificar as propriedades do solo (Weidenhamer 2006). As interações são muitas e complexas, o que dificulta muitas vezes, em condições de campo, separar alelopatia de competição.

Weidenhamer (2006) discute sobre o papel da fitotoxicidade densidade-dependente como uma forma de distinguir alelopatia de competição. O efeito da fitotoxicidade densidade-dependente é definido com a diferença em magnitude de inibição observada quando uma planta cresce em várias densidades num solo contendo a substância fitotóxica. Em solo contendo uma quantidade finita de fitotoxina, plantas que crescem em baixa densidade têm uma maior quantidade de toxinas disponível por planta e esta tende a sofrer maior redução de crescimento que as plantadas em alta densidade, onde as toxinas são diluídas entre as plantas e cada recebe, proporcionalmente, uma

dose menor. Esse é o contrário da competição, onde plantas crescendo em baixa densidade tem uma maior disponibilidade de recurso por planta e conseqüentemente apresentam um maior crescimento como resultado. Essa resposta diferenciada é um meio de distinguir fonte de competição de alelopatia.

O sucesso da prática da agricultura moderna é devido, em parte, à descoberta e adoção de químicos no controle de pragas. Realmente, o aumento exagerado dos campos cultivados associado com a “revolução verde” não teria sido alcançado sem a contribuição dos compostos sintéticos. Mas toda essa conquista trouxe a preocupação com a contaminação do meio ambiente e resistência aos pesticidas. Todavia, os herbicidas sintéticos são altamente efetivos, onde são aplicados poucas gramas por hectare e muitos deles apresentam uma boa seletividade no campo e, com uso correto, tem baixo impacto no meio ambiente na vida selvagem (Dayan *et al.* 2009). Segundo dados divulgados pela ANDEF (Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas) o Brasil consumiu em 2007 o equivalente a US\$ 2,3 bilhões em herbicidas, bem a cima do segundo colocado, os fungicidas, que ficaram na casa dos US\$1,2 bilhões, sendo a plantação de soja a líder de consumo. O aumento anual desse consumo gira em torno de 5,25% (ANDEF 2008).

A agricultura orgânica não utiliza pesticidas sintéticos, incluindo herbicidas (Lotter 2003). O controle de plantas invasoras na pratica da agricultura orgânica é muito problemático sendo realizado através de controles biológicos, uso de matéria verde (palhada) e cobertura do solo com plástico (sintético) e o uso de alguns produtos naturais são permitidos. Ao contrário dos herbicidas sintéticos, os herbicidas naturais disponíveis têm baixa seletividade e tem que ser aplicados em grande quantidade. Além disso, existe pouca literatura científica disponível que mostra o impacto dos produtos naturais na agricultura orgânica (Dayan *et al.* 2009).

Alguns problemas no controle de plantas invasoras, tanto na agricultura convencional como a agricultura orgânica, tem sido um desafio crescente. Muitos biótipos de ervas invasoras resistentes aos pesticidas comuns tem se desenrolado rapidamente (Preston 2005) e sua resistência é o resultado da evolução das populações de plantas invasoras, juntamente com herbicidas de modo de ação ineficiente. Com isso, faz se necessário uma estratégia no controle químico baseado em múltiplos modo de ação para as fitotoxinas (Macías *et al.* 2008).

Os produtos naturais de plantas são fontes quase infinitas de compostos que podem ser utilizados como fonte de novos compostos para o controle de plantas invasoras. Essa grande diversidade se dá principalmente pelas diversas rotas de origem no metabolismo da planta. As principais vias de síntese desses compostos são a via do acetato e do chiquimato, mesmo que também sejam descritos outros esqueletos procedentes da combinação destes. Rice (1984) reúne os agentes químicos em 14 grupos que incluem todos os tipos de metabólitos secundários (Figura 1). Estes compostos incluem as principais classes de quinonas, fenóis, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, taninos, terpenos, esteróides, alcalóides, entre outras. Taiz e Zeiger (2004) didaticamente classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

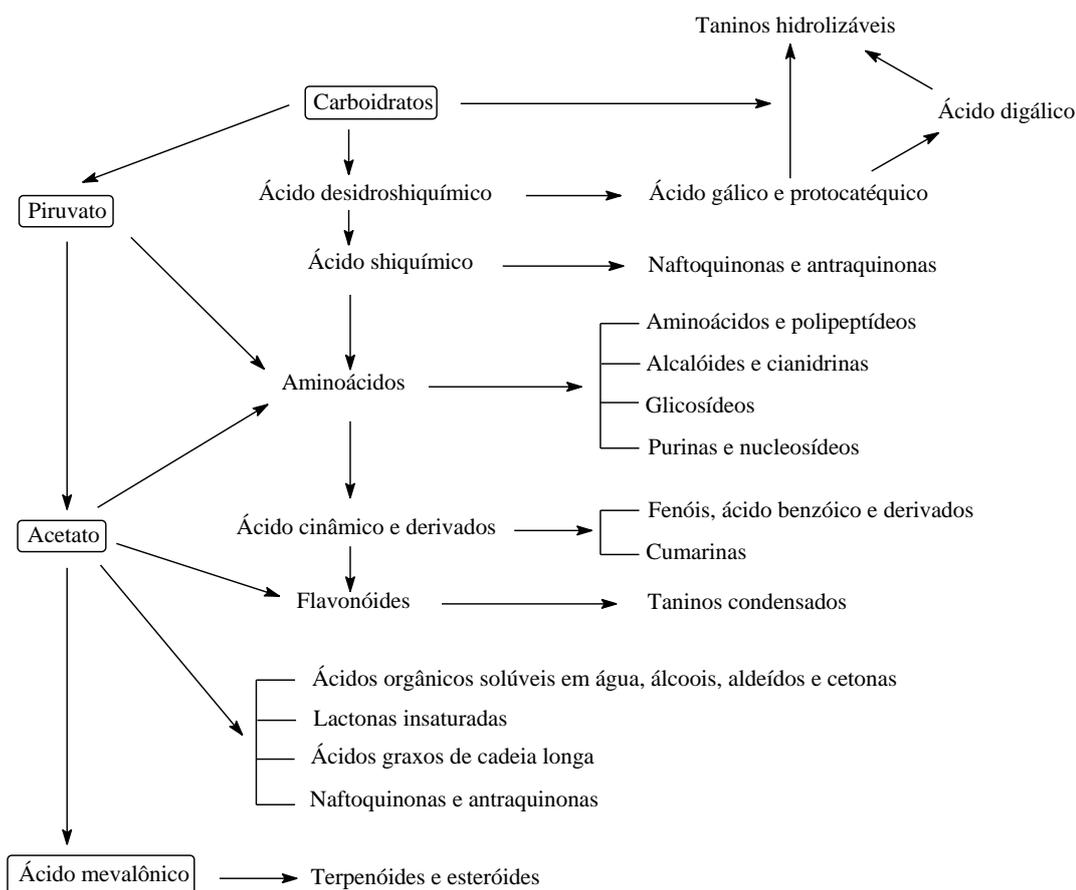


Figura 1. Agentes alelopáticos mais representativos segundo modelo proposto por Rice (1984). Rotas biossintéticas.

Esses compostos sintetizados pelas plantas podem tornar-se disponíveis no ambiente em diversas condições. A localização e sua natureza são os fatores principais que determinam o modo de liberação dos compostos aleloquímicos para o ambiente. Eles podem ser liberados por exudação, volatilização, lixiviação e/ou decomposição dos resíduos (Figura 2). Sua toxicidade no ambiente é uma função da concentração, taxa de fluxo, idade e estágio fisiológico da planta, clima, estação do ano e condições ambientais (Gniazdowska & Bogatek 2005).

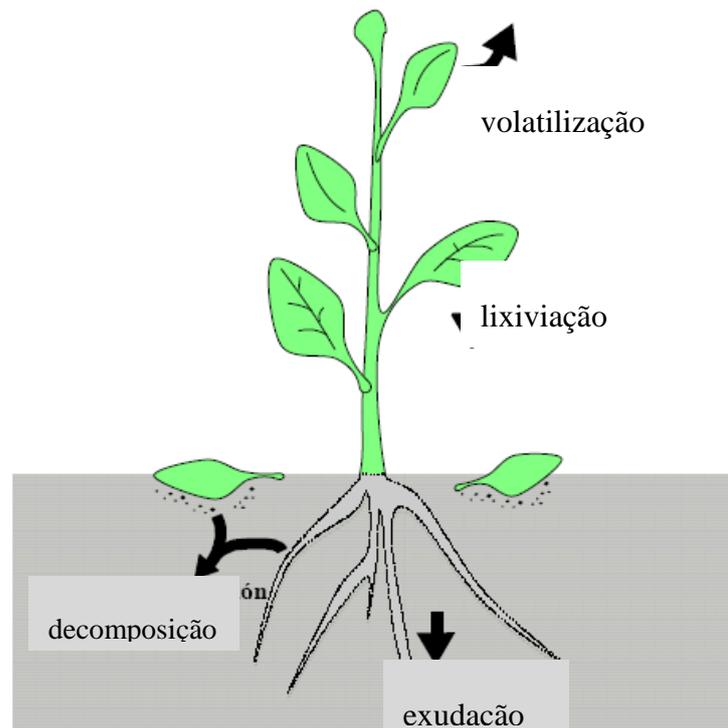


Figura 2. Mecanismos de liberação de substâncias aleloquímicas (Sánchez 2002).

Um grande número dos aleloquímicos isolados exibe sua bioatividade em baixa ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$ M) ou extremamente baixa como  $10^{-10}$ M (Macías *et al.* 2001). Uma vez esses aleloquímicos disponíveis no ambiente, há algumas hipóteses sobre como eles podem ser transferidos para a planta alvo. Eles podem ser transferidos pelo contato célula-célula ou o contato físico da raiz com o composto alelopático, sendo essa a forma de absorção mais importante (Inderjit & Duke 2003).

Um programa de descobertas de novos herbicidas é dependente de bioensaios que devem ser padronizados e reproduzíveis. As espécies selecionadas como espécie alvo

deve germinar facilmente e uniformemente e seu crescimento deve ser rápido. Espécies como alface (*Lactuca sativa* L.), *Arabidopsis thaliana* e *Echinochloa crus-galli* são alguns dos exemplos de espécies-alvo amplamente utilizadas quando se busca espécie sensível, com enfoque genômico ou plantas invasoras de arroz, respectivamente (Dayan & Duke 2006).

Bioensaios podem ser feitos em papel filtro, substrato inerte (areia ou vermiculita), hidroponia ou solo. As duas últimas formas não são muito utilizadas porque requerem uma grande quantidade de composto para serem testados. Há vários outros fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de um bioensaio. A concentração entre o total de composto químico e o tamanho da semente é uma consideração importante no potencial fitotóxico. Uma concentração particular pode ser mais fitotóxica para espécies de sementes pequenas do que para sementes grandes (Weidenhamer *et al.* 1989). No mais, outros fatores devem ser observados como efeito osmótico ou pH da solução testada se não é afetado pelo composto avaliado (Dayan & Duke 2009).

Um bioensaio é baseado na habilidade de medir um parâmetro que responda a presença do composto testado. Tipicamente, os parâmetros selecionados são: germinação, o comprimento da parte aérea e da parte radicular. Os aleloquímicos podem afetar indiretamente muitos processos fisiológicos e respostas fenotípicas para compostos específicos, mas principalmente pode ser resultado de efeito secundário, consequência do mecanismo primário (Dayan *et al.* 2000). Modificações do crescimento e desenvolvimento vegetal em resposta ao aleloquímico podem ser explicada pela alteração da moleculares da célula, ultra-estruturais tão bem como processos fisiológicos e bioquímico (Gniazdowska & Bogatek 2005).

A observação do efeito macroscópico causado por um aleloquímico num bioensaio pode indicar o modo de ação do mesmo. A inibição do crescimento radicular pode ser analisada como um experimento de medição de índice mitótico e consequentemente na divisão celular (Armbruster *et al.* 1991). Efeito na biossíntese de pigmentos fotossintéticos pode ser detectado em bioensaios de germinação e crescimento e sua posterior quantificação dos pigmentos. Experimentos de mudança de dióxido de carbono podem ser detectados através de alteração do processo fotossintético. Há vários modos de ação que podem ser detectados macroscopicamente

após um bioensaio fitotóxico, mas também pode ser facilmente medidos através de um condutivímetro, como o efeito de aleloquímicos na integridade da membrana (Macias *et al.* 2008).

Alguns exemplos do modo de ação dos aleloquímicos são mostrados a seguir. Aleloquímicos produzidos por raízes de pepino (*Cucumis sativus*) afetam, entre outros parâmetros, a taxa fotossintética, a transpiração e a atividade de enzimas antioxidantes (Yu *et al.*, 2003). Romagni *et al.* (2000) verificaram que a redução do crescimento radicular em alface (*Lactuca sativa*) pelo monoterpeno cineol foi, em grande parte, devido à inibição da enzima asparagina sintetase, envolvida na biossíntese de asparagina nos tecidos vegetais. Outro exemplo que pode ser citado é a influência da mimosina no crescimento radicular de plântulas de milho (*Zea mays*). Estas sofreram redução no índice mitótico, aumento na atividade de peroxidases e aumento na concentração de proteínas totais nos tecidos da raiz e da parte aérea (Pires *et al.* 2001). Tanto o cineol quanto a mimosina têm sido considerados excelentes herbicidas naturais para o controle do desenvolvimento de invasoras, inclusive os estudos conduzidos com o cineol permitiram identificar com maior exatidão o mecanismo de ação do seu equivalente sintético, o herbicida cinmetilina (Romagni *et al.* 2000).

As ferramentas moleculares também têm sido aliadas no estudo do modo de ação dos aleloquímicos. O estudo do genoma de *Arabidopsis thaliana* tem ajudado grandemente na descoberta de aspectos fisiológicos da atividade fitotóxica. A expressão dos genes pode ser monitorada apontando as alterações causadas pelo aleloquímico na expressão gênica e conseqüentemente a via fisiológica atingida. O uso de mutantes também é uma possibilidade já que existem vários ecótipos de *A. thaliana* que podem ser avaliadas em bioensaio e observadas as alterações no desenvolvimento e no perfil protéico (Fitter 2003; Meinke, *et al.* 1998; Pennacchio *et al.* 2005).

Historicamente, os estudos de interações alelopáticas tem sido focado principal ente na relação entre plantas cultivadas e invasoras, e recentemente, a química e o modo de ação dos aleloquímicos tem sido investigados (Einhellig, 2004). No entanto, estudos de relações dificuldades de separação do efeito aleloquímico de outros fatores. Vários estudos têm mostrando a importância da alelopatia em ecossistemas florestais e, Blanco (2007), em seu trabalho, tem mostrado vários exemplos comprovados da ação da alelopatia nestes ambientes.

O Brasil possui uma das maiores biodiversidade do planeta, sendo uma fonte inesgotável de exploração na procura de novos compostos alelopáticos na flora nativa. Dentre esses ambientes naturais brasileiros, o Bioma Cerrado é um deles. A palavra *cerrado* é de origem espanhola e significa “fechado”, devido à característica geral da vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre na formação savânica. Este é o segundo maior bioma brasileiro cobrindo cerca de dois milhões de Km<sup>2</sup> do território nacional e é composto por um mosaico contínuo de fitofisionomias que vão de campestres a florestais (Ribeiro & Walter 2008) O cerrado ocupa a porção central do Brasil, e apresenta em partes dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grasso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo, Tocantins, além do Distrito Federal (Figura 3) (Klink & Machado, 2005; Sano *et al.*, 2008).

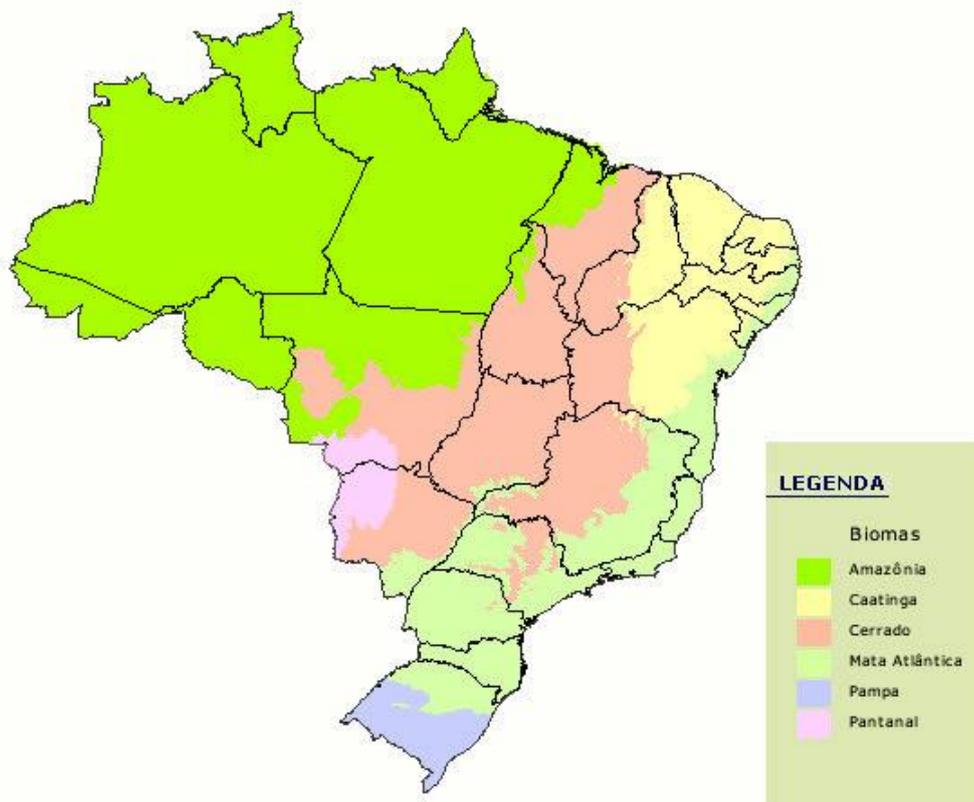


Figura 3 – Distribuição espacial dos Biomas do Brasil (escala 1:5.000.000, IBGE, 2004).

Os solos são classificados como distróficos A soma das bases trocáveis (K, Ca e Mg) é baixa, a acidez é alta, resultando em altos níveis de saturação por alumínio (Haridasan 2000).

A frequência de fogo no Cerrado, causado por ações antrópicas, é comum na estação seca e tem ocorrido por vários anos neste bioma (Coutinho 1981). Juntamente com a sazonalidade das chuvas e os poucos nutrientes no solo, o fogo tem sido apontado como determinante na estrutura e composição da vegetação do Cerrado (Moreira 2000).

O efeito alelopático é fortemente influenciado pelas questões ambientais. Em ecossistemas com alta frequência de incêndios, alta produção de aleloquímicos pelas plantas é observado (Williamson & Black 1981; Coley *et al.* 1985). Essa produção pode ser uma consequência dos danos físicos causados pelo fogo ou uma estratégia de reduzir a proliferação de grande quantidade de combustível vegetal próximo da planta doadora (Williamson *et al.* 1992). No entanto, o fogo é um importante fator de redução da concentração de aleloquímicos nos solos florestais, via queima do húmus e da liteira com alta concentração de inibidores de crescimento (Malik 2003).

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

No Distrito Federal as áreas de Cerrado são mantidas graças a presença da unidades de conservação como a Floresta Nacional de Brasília (com mais de 9.000 hectares), Parque Nacional de Brasília (30.000 hectares) e a reserva ecológica do IBGE (com mais de 1.000 hectares) (IBRAM 2009).

Recentemente, foi lançado um listagem da flora vascular do bioma Cerrado, demonstrando sua riqueza e uma lista de 12.356 espécies foram então catalogadas (Sano *et al.* 2008). Dentre essa grande diversidade encontra-se o gênero *Solanum*. O gênero *Solanum*, descrito por Carl Linnaeus, compreende 1700 espécies subcosmopolitas. O nome do gênero deriva de *solamen* = “consolo, alívio”, referindo-se aos efeitos analgésicos e sedativos de muitas de suas espécies (Stasi & Hiruma-Lima 2002). No Cerrado do Distrito Federal, já foi identificada a ocorrência de 22 espécies, sendo duas destas raras e ainda não descritas (Silva 1996). A maioria encontra-se em grandes populações e, de preferência, em ambientes perturbados como áreas de pastagens, margem de estradas ou áreas recentemente desmatada.

Evidências alelopáticas no gênero *Solanum* já foram identificadas para várias espécies (Aires *et al.* 2005; Frank 1990; Oliveira *et al.* 2004; Rice 1974; Singh *et al.* 2003) e alguns componentes já foram descritos, tais como flavonas, flavonóides e seus glicosídeos (Silva *et al.* 2003), bem como alguns alcalóides como solamargina e solasodina (Güntner *et al.* 1997).

## OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influencia de aspectos ecológicos e o estudo fitoquímicos de espécies do gênero *Solanum* presentes no Cerrado do Distrito Federal.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a atividade alelopática das folhas de três espécies de *Solanum* coletadas na época seca e chuvosa, além de diferentes idades das folhas (jovens e adultas);
2. Realizar o isolamento biodirigido das espécies de *Solanum* na busca de compostos ativos presentes nas folhas dessas espécies e,
3. Estudar as substâncias químicas presentes na folha jovens de *Solanum lycocarpum* responsável pela atividade fitotóxica dessa planta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, S. S., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2005). Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. *Acta Botanica Brasilica*, 19 (2):339-344.
- ANDEF. (2008). *Evolução do consumo de agrotóxicos no Brasil 2003-2007*. Acesso em 06 de novembro de 2009, disponível em [http://www.mmcbrazil.com.br/materiais/151009\\_consumo\\_agrotoxicos\\_br.pdf](http://www.mmcbrazil.com.br/materiais/151009_consumo_agrotoxicos_br.pdf)
- Armbruster, B., Molin, W., & Bugg, M. (1991). Effects of the herbicide dithiopyr on cell division in onion root tips. *Pest Biochemistry Physiology*, 39: 110-120.

- Ballester, A., Vieitez, A., & Vieitez, E. (1982). Allelopathic potential of *Erica vagans*, *Calluna vulgaris*, and *Daboecia cantabrica*. *Journal of Chemical Ecology*, 8(5):851-857.
- Blanco, J. (2007). The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecological Modelling*, 209(2-4): 65-77.
- Blum, U. (1999). Designing laboratory plant debris-soil bioassays: some reflections. In: Inderjit, K. Dakshini, & C. Foy, *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions* (pp. 17-23). Boca Raton: CRC Press.
- Coley, P., Bryant, J., & Chapin, F. (1985). Resource availability and plant herbivore defense. *Science*, 230:895-899.
- Coutinho, L. (1981). Aspectos ecológicos do fogo no cerrado - IV Nota sobre ocorrência e a datação de carvões vegetais encontrados no interior do solo, em Emas, Pirassununga, S.P. *Revista Brasileira de Botânica*, 4:115-117.
- Dayan, F., Cantrell, C., & Duke, S. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:4022-4034.
- Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2006). Clues in the search for new herbicides. En M. J. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, *Allelopathy: A physiological process with ecological implications* (págs. 63-83). Springer.
- Dayan, F., Romagni, J., & Duke, S. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 26:2079-2094.
- Einhelling, F. (2004). Mode of allelochemical action or phenolic compounds. In: F. Macías, J. Galindo, J. Molinillo, & H. Gutter, *Allelopathy, Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals* (p. 372). Boca Ratón: CRC Press.
- Fitter, A. (2003). Making allelopathy respectable. *Science*, 301:1337-1338.
- Frank, J. (1990). Influence of horsenettle (*Solanum carolinense*) on Snapbean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Science*, 38:220-223.

- Friedman, J. (1995). Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: J. Kigel, & G. Galili, *Seed development and germination* (pp. 629-644). New York: Marcel Dekker.
- Gatti, A. B., Perez, S. C., & Lima, M. I. (2004). Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, 18(3):459-472.
- Gniazdowska, A., & Bogatek, R. (2005). Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologia Plantarum*, 27(3B):395-407.
- Güntner, C., Gonzales, A., reis, R., Gonzales, G., Vazquez, A., Ferreira, A., et al. (1997). Effect of *Solanum* glicoalkaloids on potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(6):1651-1659.
- Harborne, J. (1997). Plant secondary metabolism. In: M. Crawley, *Plant Ecology* (pp. 132-155). Blackwell Science.
- Haridasan, M. (2000). Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12 (1), pp. 54-64.
- Humphry, R., Mortimer, M., & Marrs, R. (2001). The effect of plant density on the response of *Agrostemma githago* to herbicide. *Journal Applied Ecology*, 38:1290-1302.
- IAS (1996). International Allelopathy Society Constitution. *First World Congress on Allelopathy. A Science for the Future*.
- IBRAM (2009). Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Distrito Federal- Brasília ambiental. Acesso em 07 de novembro de 2009, disponível em <http://www.ibram.df.gov.br/>.
- Inderjit, & Duke, S. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217:529-539.
- Klink, C., & Machado, R. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1:147-155.

- Lotter, D. (2003). Organic agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 21(4):59-128.
- Macías, F., Bastidas-Oliveros, A., Marín, D., Carrera, C., Chinchilla, N., & Molinillo, J. (2008). Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Review*, 7:179-194.
- Macías, F., Galindo, J., & Galindo, J. (2007). Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, 68:2917-2636.
- Macías, F., Molinillo, J., Galindo, J., Varela, R., Simonet, A., & Castellano, D. (2001). The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. *Journal of Crop Production*, 4:237-255.
- Mallik, A. (2003). Conifer regeneration problems in boreal and temperate forest with ericaceous understory: role of disturbance, seedbed limitation, and keystone change. *Critical Review in Plant Science*, 22:341-366.
- Meinke, D., Cherry, M., Dean, C., Rounsley, S., & Koomneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana* a model plant for genome analysis. *Science*, 282:662-682.
- Moreira, A. (2000). Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. *Journal of Biogeography*, 27:1021-1029.
- Murphy, S. (2000). Field testing for pollen allelopathy: a review. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9):2155-2172.
- Nogushi, H., & Tanaka, Y. (2004). Allelopathic potential of *Citrus junos* fruit waste from food processing industry. *Bioresource Technology*, 94:211-214.
- Noor, M., Salam, U., & Kham, M. (1995). Allelopathic effects of *Prosopis juliflora* Swartz. *Journal of Arid Environments*, 94:83-90.
- Oliveira, S. C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004a). Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botânica Brasilica*, 18(3):401-406.

- Oliveira, S. C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004b). Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. *Allelopathy Journal*, 13(2):201-210.
- Oliveira, S., & Campos, M. (2006). Allelopathy of *Solanum palinacanthum* leaves on germination and seedling growth of *Sesamum indicum*. *Allelopathy Journal*, 18(2):331-338.
- Pennacchio, M., Jefferson, L., & Havens, K. (2005). *Arabidopsis thaliana* a new test species for phytotoxic bioassays. *Journal of Chemical Ecology*, 31(8):1877-1885.
- Pires, N., Souza, I., Prates, H., Farias, T., Pereira-Filho, I., & Magalhães, P. (2001). Efeito do extrato acuoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(1):55-65.
- Preston, C. (2005). Herbicide detoxification: herbicide selectivity in crops and herbicide resistance in weeds. *ACS Symp Ser*, 899:195-204.
- Ribeiro, J., & Walter, B. (2008). Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: S. & S.P.Almeida, *Cerrado: Ambiente e Flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.
- Rice, E. (1984). *Allelopathy*. New York: Academic Press.
- Romagini, J., Duke, S., & Dayan, F. (2000). Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiology*, 123:725-732.
- Sánchez, D. (2002). *Optimización de bioensayos alelopáticos aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales*. Espanha: Departamento de química organica, Facultad de ciencias, Universidad de Cádiz (Tese de doutorado).
- Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J.P. (2008). *Cerrado: Ecologia e Flora*. Embrapa Cerrados, Brasília, DF.
- Silva, S. (1996). *Gênero Solanum (Solanaceae) no Distrito Federal, Brasil*. Universidade de Brasília: Departamento de Botânica (Dissertação de mestrado).

- Silva, T., Carvalho, M., & Braz-Filho, R. (2003). Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova*, 26(4):517-522.
- Singh, H., Batish, D., & Kohli, R. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Plant Science*, 22:239-311.
- Smith, B., Pawlak, J., Murray, D., Verhalen, L., & Green, J. (1990). Interference from established stands of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) on cotton (*Gossypium hirsutum*) Lint Yield. *Weed Science*, 38:129-133.
- Stasi, L., & Hiruma-Lima, C. (2002). *Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica*. São Paulo: UNESP.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. Artmed.
- Tallamy, D., & Raupp, M. (1991). *Phytochemicals inductions by herbivory*. New York: John Wiley & Sons.
- Tefera, T. (2002). Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* extracts on seed germination and seedling growth of *Eragrostis tef*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(5):306-310.
- Tsanuo, K., Hassanali, A., Hooper, A., Khan, Z., Kaberia, F., Pickett, J., et al. (2003). Isoflavanones from the allelopathic aqueous root exudate of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry*, 64:265-273.
- Viles, A., & Reese, R. (1996). Allelopathic potential of *Echinaceae angustifolia* D.C. *Environmental and Experimental Botany*, 36(1):39-43.
- Weidenhamer, J., Hartnett, D., & Romeo, J. (1989). Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *Journal of Applied Ecology*, 26:613-624.
- Weidenhamer, J. (2006). Distinguishing allelopathy from resource competition: the role of density. In: M. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (pp. 85-104). The Netherlands: Springer.
- Williamson, G., & Black, E. (1981). High temperature forest fires under pines as a selective advantage over oaks. *Nature*, 293, pp. 634-644.

- Willianso, G., Richardson, D., & Fischer, N. (1992). Allelopathic mechanism in fire-prone communities. In: S. Rizvi, & V. Rizvi, *Allelopathy: Basic and Applied Aspects* (pp. 57-75). London: Chapman & Hall.
- Willis, R. (2007). *The History of Allelopathy*. The Netherlands: Springer.
- Yu, J., Ye, S., Zhang, M., & Hu, W. (2003). Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31:129-139.

# Capítulo 1

**Efeito alelopático de diferentes matrizes,  
sazonalidade e idade das folhas de três  
espécies de *Solanum* do Distrito Federal.**

## EFEITO ALELOPÁTICO DE DIFERENTES MATRIZES, SAZONALIDADE E IDADE DAS FOLHAS DE TRÊS ESPÉCIES DE *SOLANUM* DO DISTRITO FEDERAL

**RESUMO:** O efeito alelopático é diretamente influenciado pelos fatores ambientais e genéticos. Em situação de estresse, a produção dos aleloquímicos pode ser alterada. O estágio de desenvolvimento da planta doadora também afeta o efeito alelopático e em tecidos mais jovens se observa uma maior produção de aleloquímicos que são perdidos ao longo do amadurecimento do órgão. O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade alelopática de folhas jovens e adultas de 10 matrizes, de três espécies de *Solanum* (*S. lycocarpum*, *S. subumbellatum* e *S. granuloso-leprosum*) coletadas em duas estações, seca e chuvosa. Foram realizados experimentos de germinação e crescimento em substrato papel filtro e foram avaliados a germinabilidade, o tempo médio da germinação e a porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular do gergelim. Dentro dos parâmetros avaliados, a germinação sofreu maior influência no tempo médio, causada por extratos de folhas adultas, e a germinabilidade, causada por extratos de folhas jovens, e o período chuvoso mostrou maior efeito. Já no crescimento, a parte radicular foi a mais afetada pela presença dos extratos de folhas jovens coletadas na época da seca. Houve diferença de resposta do efeito dos extratos entre as matrizes, mostrando o papel da variabilidade genética das espécies. A época de seca foi onde, na maioria dos casos, observou-se maior efeito inibitório e as folhas jovens mostrando uma maior produção de compostos secundários.

**Palavras-chave:** cerrado, germinação, tempo médio, estação seca, estação chuvosa.

**ABSTRACT:** The allelopathic effect is directly influenced by environmental and genetic factors. Under stress, the production of allelochemicals can be changed. The developmental stage of the donor plant also affects the allelopathic effects on younger tissues and is a higher production of allelochemicals that are lost during the maturation of the organ. The objective of this study was to compare the allelopathic activity of young and mature leaves of 10 matrices of three species of *Solanum* (*S. lycocarpum*, *S. subumbellatum*, and *S. granuloso-leprosum*) collected in two seasons, dry and wet. Experiments of germination and growth were carried out on filter paper substrate and germination, the average evaluated percentage of germination and growth inhibition of shoot and root of sesame. Within the parameters evaluated, the germination was most influenced on the average time caused by extracts of adult leaves and on germination caused by extracts of young leaves and the wet season showed the greatest effect. In the growth, the root was the most affected by the presence of extracts of young leaves collected in the dry season. There were differences in response of the effect of extracts among matrices showing the role of genetic variability of the species. The dry season was where, in most cases, there were greater inhibitory effect and the young tissues showing a higher production of secondary compounds.

**Key words:** cerrado, germination, average time, dry season, rainy season.

## INTRODUÇÃO

O segundo maior bioma do Brasil em extensão (2 milhões de km<sup>2</sup>), o Cerrado, possui como característica marcante a sazonalidade entre a estação chuvosa e a estação seca. A chuva concentra-se entre os meses de outubro a março, seguida de um período seco, de abril a setembro (Klink & Machado 2005). Durante a estação seca no Cerrado, o solo está sujeito a um déficit hídrico sazonal nas camadas mais superficiais afetando as plantas de porte herbáceos e arbustivo (Haridasan 2000), exigindo adaptações da vegetação, como regulação do potencial de água e trocas gasosas como forma de evitar os danos causados pelo estresse hídrico desse período (Prado *et al.* 2004).

A produção de metabólitos secundários pela planta é determinada pela sua genética em combinação com fatores ambientais (An *et al.* 2003). Interações com diferentes fatores ambientais têm um importante papel na expressão da alelopatia (Blanco 2007), que é a inibição e/ou estímulo do crescimento e desenvolvimento de outras plantas através da liberação de aleloquímicos (compostos secundários com atividade) (Dakshini *et al.* 1999). Fatores de estresse podem influenciar tanto a produção dos aleloquímicos pela planta doadora como modificar o efeito dos aleloquímicos na planta receptora (Pedrol *et al.* 2006) e os estresses bióticos também exercem sua influência (Gawronska & Golisz 2006). A concentração do aleloquímico na planta doadora pode ser influenciada pelas condições ambientais, tais como temperatura, luz, estrutura do solo e disponibilidade de nutrientes (Chaves & Escudero 1999). Os efeitos de alguns estresses abióticos na produção de metabólitos secundários são bem conhecidos e descritos por Rice (1974).

Estresse hídrico, causado por seca ou estresse osmótico, em geral pode estimular o acúmulo de monoterpenos (Kainulainen, *et al.* 1992), ácido clorogênico (del Moral 1972), ácido hidroxâmico (Richardson & Bacon 1993) ou fenóis, em geral (Karageorgos *et al.* 2002). A atividade alelopática de plantas que crescem em solo seco é maior que as interações alelopáticas provocadas por plantas que crescem em solo irrigado. Em condições de campo, sob condições de estresse hídrico, o crescimento da planta-alvo pode ser reduzido devido à grande quantidade de aleloquímico por peso seco se comparado com locais onde há ausência de estresse hídrico (Pedrol *et al.* 2006).

Esse fator pode ainda causar problemas de autotoxicidade em condições de campo (Tongam *et al.* 2001).

O estágio fenológico da planta doadora também exerce uma influência na indução da produção dos aleloquímicos e seu custo para a planta. Hoballah *et al.* (2004) mostraram que a indução da produção de metabólitos secundários em milho somente foi detectável em plantas jovens ou em folhas muito jovens imediatamente após a sua exposição ao estresse. Esse investimento da indução da produção dos metabólitos secundários tem relação direta com a atividade alelopática, uma vez que melhora a chance de estabelecimento na pequena área onde ocorre a planta. An *et al.* (2003) propõem dois tipos de produção de aleloquímicos em plantas: influenciado pela idade e pelo estresse da planta, e são reflexo da dinâmica do meio ambiente. O declínio no conteúdo de aleloquímico com o aumento da idade da planta pode ser observado em diversos casos (Copaja *et al.* 1999, An *et al.* 2003). Mas também há casos que apresentam uma dinâmica alternativa com picos de produção em estágios tardios de desenvolvimento (Kato-Noguchi & Ino 2005) ou que o aleloquímico aumenta sua produção com a idade da planta (Reinhardt, *et al.* 2006).

Chou (1999) sugeriu que aleloquímicos poderiam regular o nível populacional de acordo com as condições de crescimento e disponibilidade de recurso, além do papel da autotoxicidade. Uma vantagem na manutenção da dominância na comunidade vegetal pode ser mantida pela produção de aleloquímicos em alta quantidade durante todo o ciclo de vida da planta. O aumento da produção e seu acúmulo no final do ciclo de vida também podem ser um ponto estratégico já que os “resíduos alelopáticos” poderão vir a inibir a germinação e o estabelecimento de outras, ou da mesma, espécie (Nilsson & Zackrisson 1992; Wallstedt *et al.* 1997).

A família Solanaceae é conhecida por produzir muito compostos secundários, tais como terpenos, saponinas esteroidais, alcalóides esteroidais e glicocalcólides (Eich 2008). Dentro de gênero *Solanum*, há estudo da presença de compostos como solasodina, solamargina e solanina, presentes com frequência nas espécies desse gênero. No Distrito Federal, há a ocorrência de 22 espécies de *Solanum* distribuídas em diferentes fitofisionomias (Silva 1996). Essas espécies são muito comuns em ambientes perturbados de Cerrado e espécies como *S. lycocarpum* já demonstraram evidências de atividade alelopática (Oliveira *et al.* 2004).

Com isso, este trabalho teve como objetivos verificar a atividade alelopática de extratos aquosos de folhas jovens e adultas de diferentes matrizes de três espécies de *Solanum* presentes no Distrito Federal, coletadas em diferentes épocas do ano (chuva e seca) sobre a germinação e crescimento do gergelim.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA DO MATERIAL

Foram feitas duas coletas, uma na estação seca (junho/2006) e outra na estação chuvosa (fevereiro/2007), e as condições de precipitação na época da coleta encontra-se na Figura 1.1.

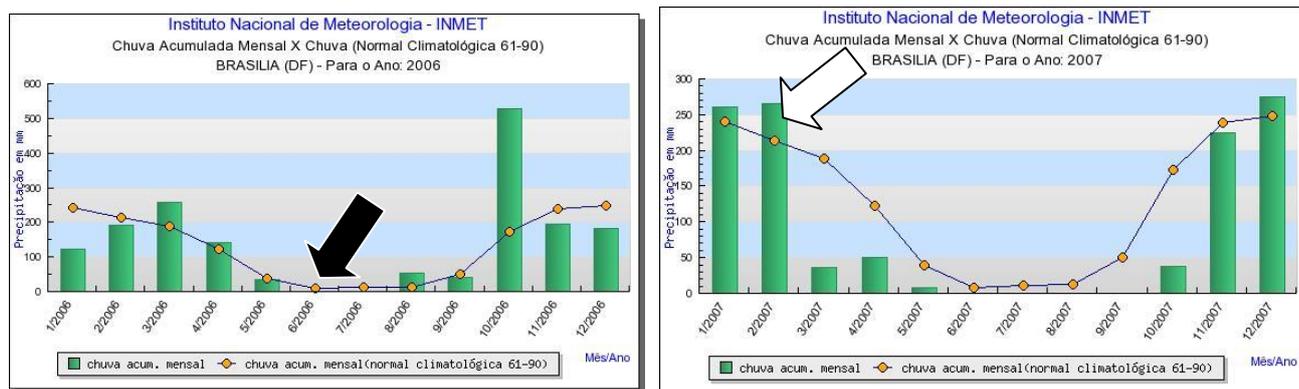


Figura 1.1. Precipitação pluvial média mensal dos anos de 2006 e 2007 da região de Brasília. As setas indicam os meses de coleta na época de seca (seta escura) e época de chuva (seta clara). Fonte: INMET

As três espécies estudadas foram: *Solanum lycocarpum* A.St-Hil., *S. granuloso-leprosum* Dunal e *S. subumbellatum* Vell. As folhas das três espécies foram coletadas de 10 matrizes diferentes (marcadas com placa de metal), na região da Fazenda Sucupira, de propriedade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada Brasília-DF, (S15°55'41,9"W 048°01'46,2"). As 10 matrizes foram selecionadas com uma distância mínima de 20 metros uma das outras. As suas folhas coletadas foram separadas em folhas jovens (acima do segundo nó), e folhas adultas (maduras, abaixo do

segundo nó). Estas folhas foram devidamente identificadas e acondicionadas em sacos de papel e levadas para o laboratório de botânica da Universidade Católica de Brasília.

---

## ESPÉCIES ESTUDADAS

### *Solanum lycocarpum* A.St-Hil.

---

Conhecida popularmente como lobeira ou fruta-do-lobo, é um arbusto armado de 1,5 a 4,0 m de altura. Ocorre em cerradão, campo sujo, cerrado perturbado, geralmente à beira de estrada. Floresce e frutifica o ano todo (Oliveira 2003). Possui flores roxas com cerca de 4,1 cm de diâmetro que chamam a atenção pela sua beleza. É alimento importante para o lobo-guará e seus frutos vêm sendo utilizados na fabricação de doces e geléias (Silva *et al.* 1994). Os frutos dessa espécie são os maiores desse gênero (Silva 1996) (Figura 2.1).



Figura 2.1. Flores e frutos de *S. lycocarpum*

### *Solanum subumbellatum* Vell.

---

Conhecida popularmente como velame-do-cupim, jurubeba-de-cupim ou jurubebinha. É um arbusto cerca de 0,30 a 1,5 m de altura e é encontrada em cerrado, campo sujo, campo cerrado, geralmente na beira da estrada. É utilizada na medicina popular para tratamento de gripe, bronquite e asma (Rodrigues & Carvalho 2001). Floresce e frutifica o ano todo. Frutos vermelhos e amarelados na maturidade são características que a distinguem das outras espécies que ocorrem no DF (Silva 1996) (Figura 3.1).



Figura 3.1. Flores e arbusto de *S. subumbellatum*

### *Solanum granuloso-leprosum* Dunal

---

Conhecida popularmente como fumo-bravo ou tabaquilo. É um arbusto cerca de 1,0 a 2,5 m de altura e possui na base do pecíolo folhas geminadas, verde-esbranquiçadas, velutinas, flores lilases



Figura 4.1. Frutos e arbusto de *S. granuloso-leprosum*

e presença de tricomas nos ramos. É muito frequente em terrenos baldios e floresce de julho a setembro e frutifica de julho a outubro (Silva 1996) (Figura 4.1).

#### PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Logo após a coleta das folhas, essas foram secas em estufa ventilada, a 50 °C. até peso constante. O material seco foi triturado e com o pó assim obtido foram preparados os extratos aquosos a 1, 3 e 5% (p/v) e água destilada como controle. Esse material foi extraído a frio e permaneceu durante 24 h a 4 °C. Após esse procedimento, os extratos foram filtrados em papel filtro, com a ajuda de uma bomba a vácuo acoplada a um funil. O material filtrado foi imediatamente utilizado.

#### BIOENSAIOS PARA VERIFICAR EFEITO ALELOPÁTICO NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Nos bioensaios, foram utilizadas sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L. – Pedaliaceae) como espécie-alvo. No experimento de germinação, 25 sementes de gergelim foram colocadas para germinar em placas de Petri (90 x 150 mm), forradas com papel filtro e adicionados 5 mL do extrato testado. A contagem das sementes germinadas era realizada diariamente, durante sete dias, retirando-se das placas as sementes germinadas. Esse bioensaio foi conduzido em câmaras B.O.D., com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi realizado com três repetições e o critério de germinação utilizado foi a protusão da radícula. Ao final do experimento, calculou-se a germinabilidade e o tempo médio de acordo com as fórmulas abaixo:

Germinabilidade (G%)

$$G\% = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N} 100$$

onde  $\sum_{i=1}^n x_i$  é a soma das sementes de cada matriz  $i$  germinadas, em relação ao número total de sementes (N) colocadas à germinar, sendo os dados expressos em porcentagem.

Em seguida, essa porcentagem foi calculado a porcentagem de inibição em relação ao controle com água destilada e os resultados apresentados em forma de gráficos.

Tempo médio de germinação ( $T_{med}$  - horas)

$$T_{med} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i t_i)}{\sum_{i=1}^n x_i}$$

e que  $x_i$  é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo  $t_i$ . Essa informação é normalmente expressa em horas (Ferreira & Borghetti, 2004).

#### BIOENSAIOS PARA VERIFICAR EFEITO ALELOPÁTICO NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS

Sementes de gergelim foram previamente germinadas em caixas Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), forradas com papel filtro banhado com 12 mL de água, a encubadas a 30 °C. Após a germinação (período de 24 horas), vinte sementes pré-germinadas eram colocadas para crescer em caixas Gerbox forradas com papel filtro banhado com 12 mL dos extratos avaliados e os tratamentos foram feitos em triplicata. As concentrações foram as mesmas utilizadas para o bioensaio de germinação e o experimento foi feito em triplicata. O tempo de crescimento foi de sete dias, a 25 °C e 12 horas de fotoperíodo. As plântulas tiveram suas partes aéreas e radiculares medidas com ajuda de um paquímetro digital. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição da parte aérea e radicular em relação ao controle, a partir da fórmula:

Porcentagem de inibição

$$\%inibição = \left( \frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) \times 100\%$$

onde  $\bar{X}T$  é a média de alongamento dos tratamentos e  $\bar{X}C$ , a média de alongamento do controle.

---

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes preliminares realizados em laboratório e a análise dos resultados, esses apresentavam normalidade compatível para se utilizar uma análise paramétrica. Então, optou-se por comparar os resultados obtidos nos experimentos, utilizando um programa estatístico, SISVAR<sup>®</sup> ver. 4.6., no módulo análise de variância (ANOVA), e as medidas comparadas segundo o teste de Tukey, a 5% de significância.

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### EFEITO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Na tentativa de facilitar a análise dos dados, esses foram separados entre o efeito dos extratos aquosos analisados na germinação e no crescimento do gergelim. Além disso, também esses efeitos foram separados por espécie doadora. As figuras a seguir indicam a média da porcentagem de germinação e o tempo médio de germinação do gergelim tratados com extrato aquoso de folhas jovens e adultas coletadas em duas épocas do ano, estação de seca e chuvosa de 10 matrizes.

*Solanum lycocarpum*

## Germinabilidade

O efeito dos diferentes extratos aquosos de folhas de *S. lycocarpum* na porcentagem de inibição da germinabilidade das sementes de gergelim pode ser observado na Figura 5.1.

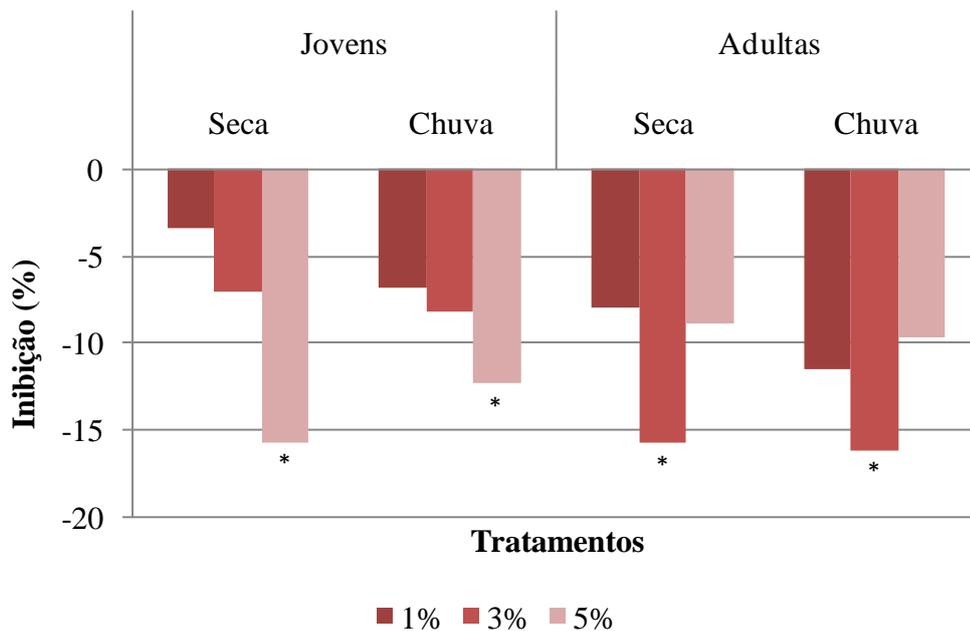


Figura 5.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes de *S. lycocarpum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Essa porcentagem de inibição é uma média do efeito na germinabilidade do gergelim ocasionado pelo extrato de folhas coletadas das 10 diferentes matrizes. O que se observa é uma inibição modesta e que o efeito do extrato de folhas jovens apresentou uma inibição dose-dependente da concentração, fato não observado para o efeito dos extratos de folhas adultas, uma vez que a concentração intermediária (3%) apresenta maior inibição em média.

O efeito do extrato de folhas adultas coletadas tanto na estação seca quanto na chuvosa na concentração intermediária do extrato (3%), este mostrou uma inibição 2

vezes maior na germinabilidade comparado com as outras concentrações. Esse fato pode ser devido à alta concentração dos compostos alelopáticos presentes no extrato a 5%, competindo entre si para agir na inibição da germinação, e à diluição dos mesmos compostos a 1%, tendo então a ação reduzida. Sendo assim, a 3% no extrato da folha adulta encontra-se a concentração ideal dos aleloquímicos que podem inibir a germinação de sementes do gergelim.

### Tempo médio

Ao se analisar a média do tempo médio de germinação do gergelim nos diferentes extratos das 10 matrizes estudadas, observou-se maior tempo médio de germinação para os tratamentos com extratos de folhas coletadas no período de seca (a 5%) ao passo que para os tratamentos com folhas coletada na época de chuva observa-se um efeito contrário (Figura 6.1).

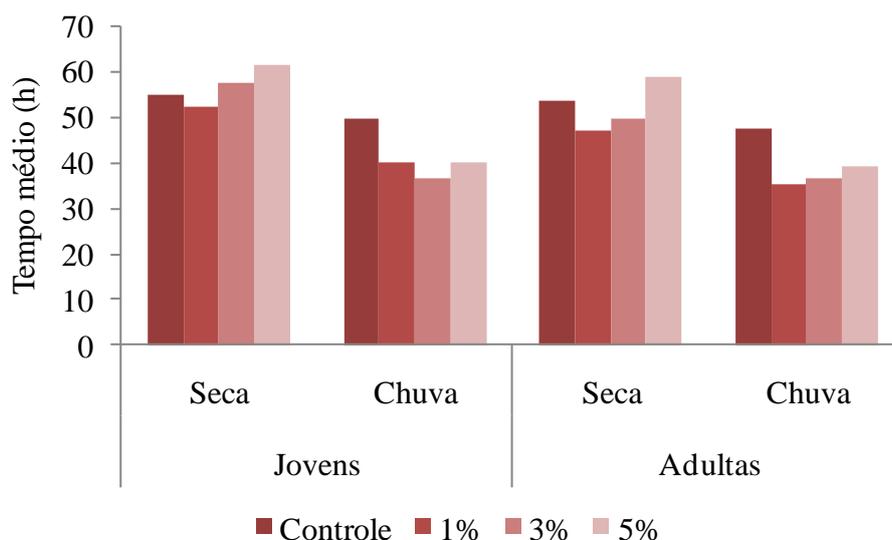


Figura 6.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S.lyocarpum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Esse fato pode ser um indicador de que os aleloquímicos presentes no período da chuva já não tenham a mesma composição e concentração dos aleloquímicos presentes nas folhas na época de seca, possivelmente ocasionado pela lixiviação dos compostos alelopáticos.

*Solanum subumbellatum*

## Germinabilidade

O efeito dos diferentes extratos aquosos de folhas de *S. subumbellatum* na porcentagem de inibição da germinabilidade das sementes de gergelim pode ser observado na Figura 7.1.

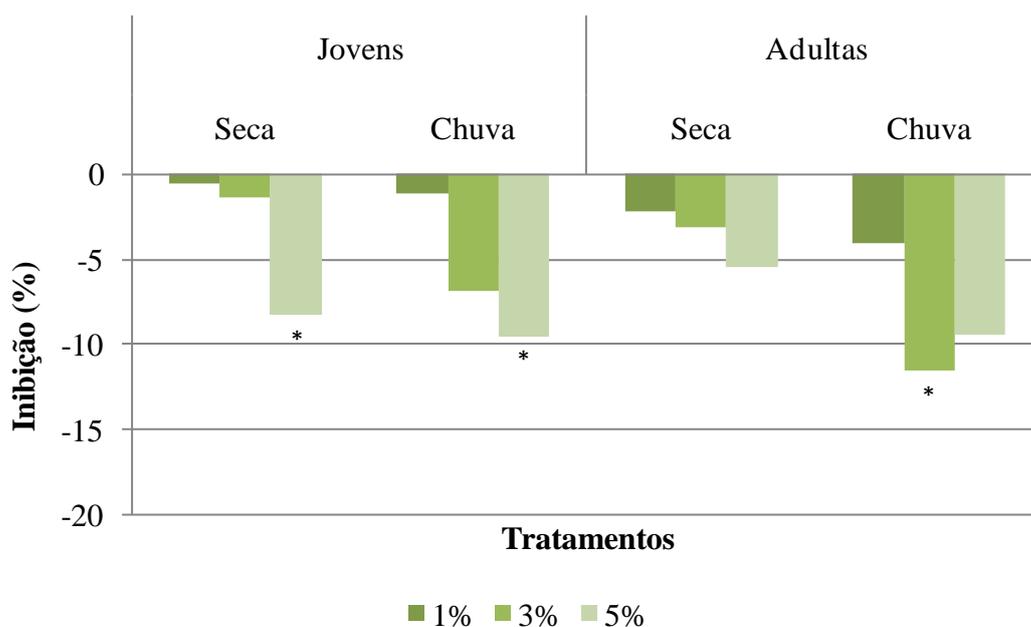


Figura 7.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 matrizes de *S. subumbellatum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Analisando a germinabilidade do gergelim afetado por extrato de folhas coletadas na estação seca, houve uma redução significativa da germinabilidade de extratos oriundos de folhas jovens. Na estação chuvosa, não houve redução da germinabilidade do gergelim tratado com extrato de folha de nenhuma das matrizes analisadas. Observa-se uma inibição dose-dependente da concentração dos extratos de folhas jovens coletadas nas duas estações, fato observado para folha adulta somente na estação de seca.

A comparação do efeito do extrato aquoso de folhas coletadas nas diferentes estações mostra que, para *S. subumbellatum*, as folhas coletadas na época chuvosa, em média, inibiram um pouco mais (por volta de 2x) a germinabilidade do que as folhas

coletadas na época da seca. Observa-se que para folhas adultas coletadas na época da chuva, há o mesmo comportamento de maior inibição da germinabilidade do gergelim a 3%, como também ocorreu para *S. lycocarpum*. Quanto aos extratos aquosos de folhas jovens e adultas, a inibição da germinabilidade do gergelim foi independente do estágio de desenvolvimento das folhas coletadas. A diferença entre as estações é o que foi mais importante, sendo que os extratos produzidos por folhas coletadas na estação chuvosa foram os que apresentaram maior efeito inibitório da germinabilidade do que o extrato de folhas coletadas na estação seca, para essa espécie, comportamento contrário ao observado para os biotestes realizados com *S. lycocarpum*.

### Tempo médio

Comparando as duas estações estudadas, o tempo médio de germinação do gergelim sofreu mais influência dos extratos de folhas coletadas na época chuvosa do que na época de seca, como também foi observado para a germinabilidade (Figura 8.1).

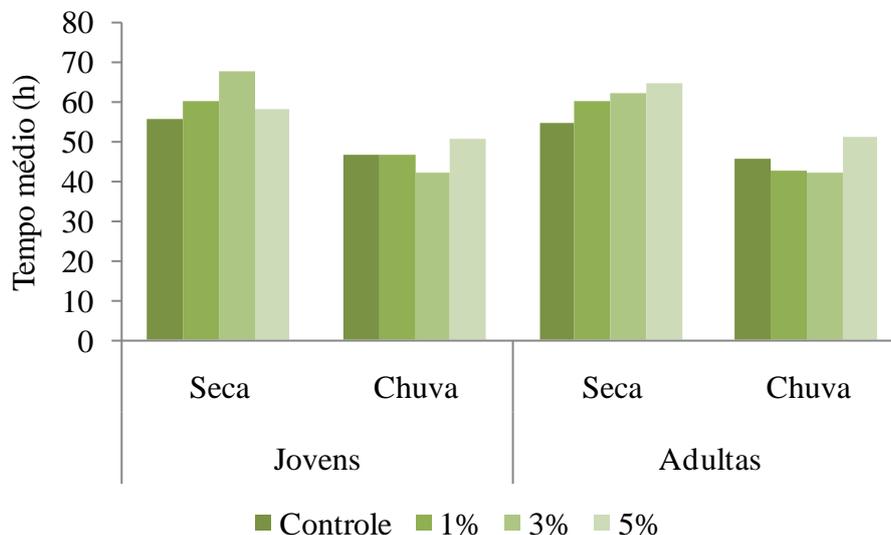


Figura 8.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. subumbellatum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

Analisando os valores médios do tempo médio de germinação do gergelim tratado com os extratos de folhas coletadas das diferentes matrizes doadoras, observa-se

que com o aumento da concentração do extrato há um aumento do tempo médio de germinação nas concentrações mais altas e uma flutuação nas concentrações intermediárias.

Analisando o efeito do extrato originados de folhas jovens e adultas no tempo médio de germinação do gergelim através do incremento do tempo médio entre o controle e a concentração mais alta do extrato (5%), nota-se que as extrato de folhas adultas aumentaram 18 e 13% o tempo médio em relação ao controle da estação seca e chuvosa, respectivamente, e já para o extrato de folhas jovens esse aumento foi de 3 e 8%. Com isso, é possível concluir que os extratos das folhas adultas foram mais efetivos no aumento do tempo médio de germinação do gergelim do que os extratos de folhas jovens de *S. subumbellatum* mesmo não apresentando uma diferença significativa do controle.

---

*Solanum granuloso-leprosum**Germinabilidade*

O efeito dos diferentes extratos aquosos de folhas de *S. granuloso-leprosum* na porcentagem de inibição da germinabilidade das sementes de gergelim em relação ao controle pode ser observado na Figura 9.1.

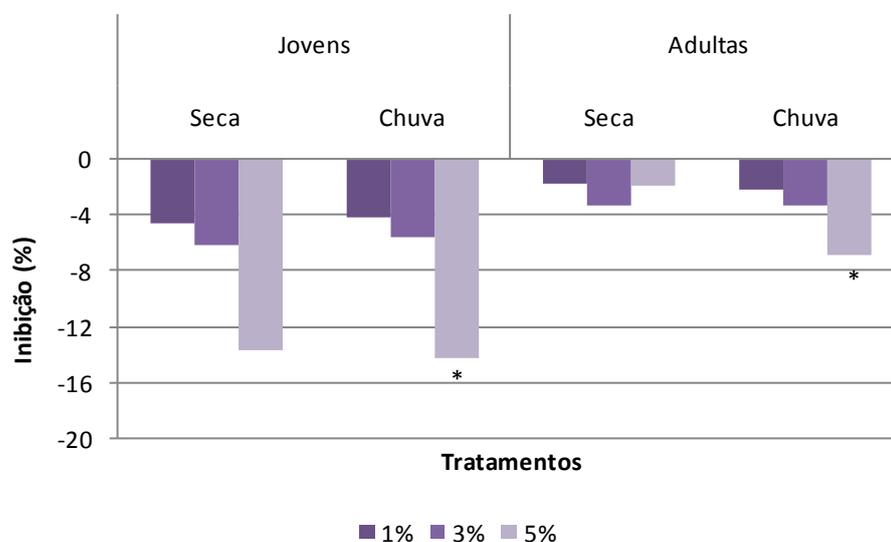


Figura 9.1. Inibição média da germinabilidade de sementes de gergelim, tratadas com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 matrizes de *S. granuloso-leprosum*, coletadas nas épocas de seca e de chuva. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Mais uma vez, fica evidente que os extratos de folhas jovens de *S. granuloso-leprosum* foram mais eficientes na inibição da germinabilidade do gergelim do que os extratos de folhas adultas, e sem diferença entre as estações, chegando a ser três vezes maior o efeito inibitório. Isso indica que, independente da sazonalidade, as folhas mais jovens de *S. granuloso-leprosum* encontram-se com uma dose de compostos secundários suficientes para causar inibição da germinação do gergelim, se comparadas com extratos produzidos pelas folhas adultas.

### Tempo médio

A interferência de extratos de folhas jovens e adultas no tempo médio da germinação do gergelim, coletadas na estação seca, não diferiram entre si. Todavia, os extratos de folhas adultas coletadas na época da chuva, apresentaram atraso no tempo de germinação e, para os extratos de folhas jovens causaram o mesmo efeito. Na Figura 10.1 é possível analisar a média do tempo médio de germinação do gergelim tratados com extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. granuloso-leprosum* coletadas nas duas estações das 10 diferentes matrizes doadoras.

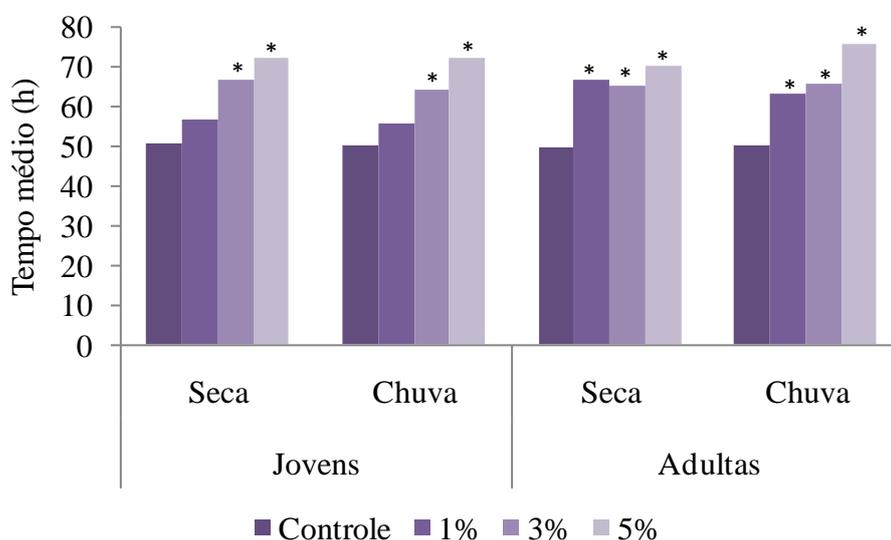


Figura 10.1. Efeito do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de *S. granuloso-leprosum* coletadas em diferentes épocas do ano (seca e chuva) no tempo médio de germinação de sementes de gergelim. Extratos a 1, 3 e 5% p/v e controle com água destilada. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

O aumento do tempo de germinação do gergelim ocorreu em todos os tratamentos e foi proporcional à concentração do extrato. Esse incremento do tempo médio produzido por extrato de folhas adultas e jovens, se comparado o extrato de maior concentração com o controle, as folhas jovens coletadas na estação seca aumentaram em 44% o tempo médio de germinação do gergelim, enquanto que os extratos das folhas adultas aumentaram, nas mesmas condições, 40% do tempo médio. Na estação chuvosa, os extratos das folhas jovens aumentaram 42% e os das folhas

adultas 50%. Analisando dessa forma, os extratos aquosos de folhas adultas coletadas na estação chuvosa aumentam levemente a mais o tempo médio de germinação comparado com os outros experimentos.

Na Figura 11.1, encontra-se um fluxograma que mostra de forma simplificada os principais resultados sobre o efeito dos extratos das espécies de *Solanum* na germinação do gergelim.

Dentro dos parâmetros analisados, o maior efeito na germinação pode ser percebido, para todos os extratos das folhas de *Solanum*, em uma maior influência no tempo médio de germinação do que sobre a germinabilidade em si. Para alguns trabalhos realizados com o efeito de extrato de plantas na germinabilidade, existem casos de redução significativa desse parâmetro, inclusive para extrato de espécies do Cerrado. Alguns exemplos são para *Machaerium acutifolium* (Povh *et al.* 2007), *Bacharis dracunculifolia* (Rozete *et al.* 2007) e *Casearia sylvestris* (Sousa *et al.* 2007). Mas também há vários casos onde não ocorre o efeito inibitório na germinabilidade, mas há um efeito inibitório significativo no tempo médio de germinação, como para outras espécies (Gorla & Perez 1997; Giotto *et al.* 2007; Gatti *et al.* 2004; Periotto *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004).

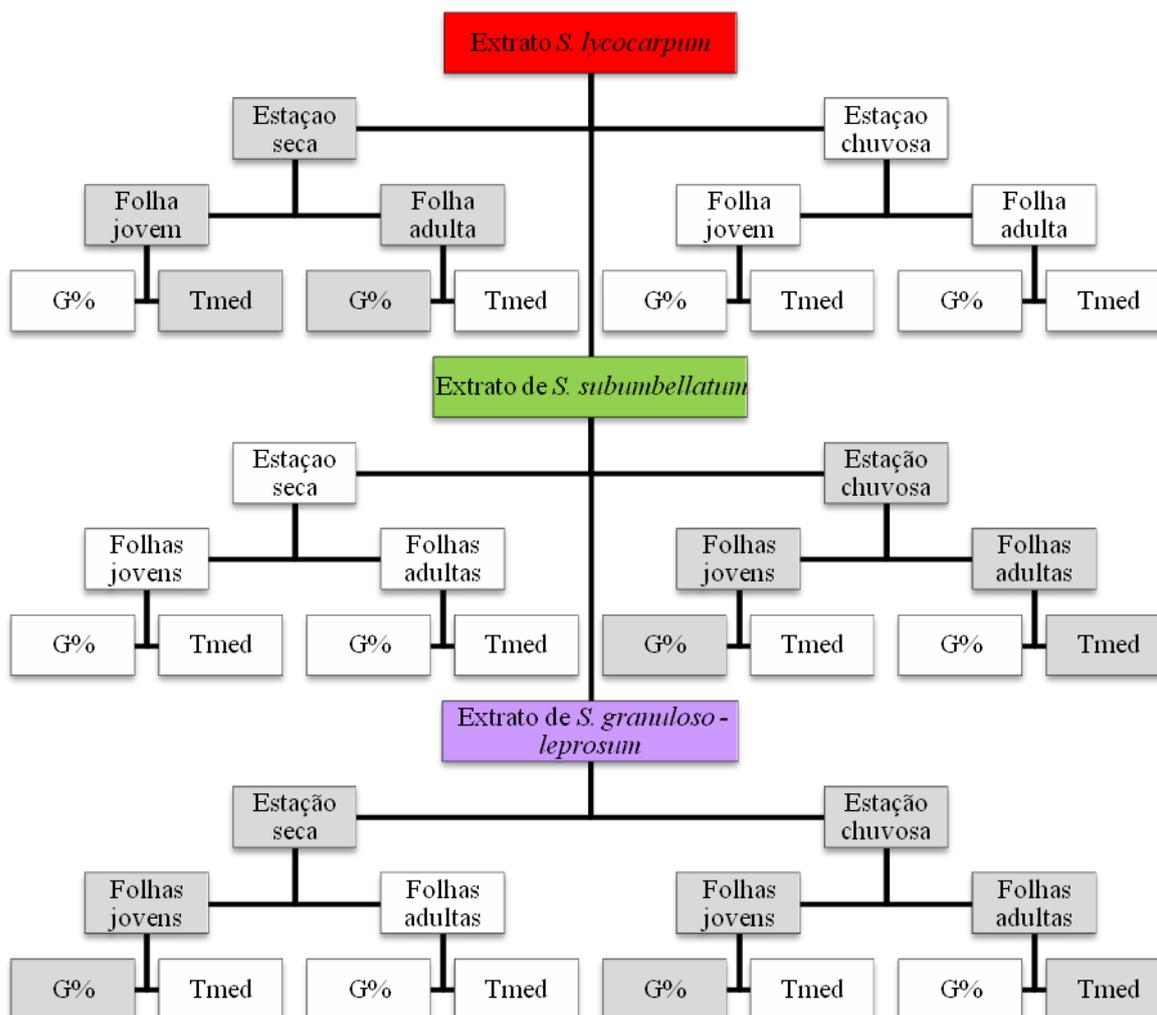


Figura 11.1. Resumo da atividade alelopática inibitória das três espécies de *Solanum* na germinabilidade (G%) e tempo médio (Tmed) das sementes de gergelim, tratadas com extrato de diferentes tipos de folha (jovem e adulta), coletadas em duas épocas do ano (seca e chuva). Áreas coloridas significam maior inibição dos tratamentos em relação ao controle.

Muitas vezes, o efeito alelopático não se manifesta sobre a porcentagem de germinação, mas sobre o tempo em que essa semente pode levar para germinar (Ferreira 2004). Este fator pode ter um significado ecológico importante, pois plantas que germinam lentamente podem apresentar tamanho reduzido e como consequência serem mais suscetíveis a influências externas e terem menores chances de competição por recurso (Jefferson & Pennachio 2005).

No entanto, o efeito dos aleloquímicos na germinação de sementes pode aparecer através da disfunção do metabolismo celular normal, além de danos a organelas. A atuação na mobilização de reservas, um processo que ocorre rapidamente durante os estágios iniciais da germinação de sementes, também pode ser vistas como um fator que leva ao atraso ou à diminuição da germinação (Gniazdowska & Bogatek 2005).

Entre as estações estudadas, o maior efeito dos extratos na germinação foram nas das folhas coletadas na estação seca para *S. lycocarpum* e na chuvosa para *S. subumbellatum* e *S. granuloso-leprosum* (Figura 11). É bem conhecido que, para algumas plantas, o estresse do ambiente cause aumento na produção de compostos secundários. Como por exemplo, os teores de óleos voláteis de *Lippia alba* foram superiores na estação de seca em relação à estação chuvosa (Santos & Innecco 2003). Outro trabalho que relata a influência da sazonalidade na atividade alelopática é o de Jacobi e Ferreira (1991), mostrando que extrato aquoso de *Mimosa bimucronata* inibiu a germinação de espécies cultivadas e esta foi dependente da época de coleta das folhas. Blanco (2007) também relata o aumento na produção de cumarinas por *Helacleum lanatum*, exposta a condições de temperatura elevada.

Considerando que todas as espécies estudadas estavam submetidas aos mesmos tipos de estresse na aérea de coleta (seca e chuva), pode-se dizer que as diferenças obtidas nos bioensaios frente a esses extratos sejam devido às características genéticas de cada espécie associada à situação de estresse, seja ele por restrição hídrica (seca), seja por excesso de água (chuvoso). Outro fato que também não se pode ignorar é da influência da fertilidade do solo e interações com outras espécies. Com isso, pode-se explicar a diferença de resposta entre as espécies estudadas e ressaltar a complexidade desses estudos em condições de campo.

Quanto à influência dos extratos de folhas de diferentes idades (jovem ou adulta) no efeito alelopático, o que chama a atenção é que para cada um dos parâmetros analisados (germinabilidade ou tempo médio), há um tipo de folha associada. Analisando novamente o resumo de todos os efeitos na Figura 11, *S. subumbellatum* e *S. granuloso-leprosum* mantiveram o mesmo padrão, no qual folhas jovens influenciaram a germinabilidade e folhas adultas o tempo médio. Em *S. lycocarpum*, observou-se o efeito contrário.

Há numerosos exemplos de casos onde a concentração do aleloquímico aumenta com a idade do órgão (Feeny 1970; Inderjit & Asakawa 2001; Maufette & Oechel 1989; Nilsson *et al.* 1998), mas também há evidências da diminuição desses aleloquímicos ao longo do desenvolvimento do órgão (Inderjit & Duke 2003), sendo a maior concentração em plantas jovens (An *et al.* 2003; Dayan 2006; Marchi, *et al.* 2008). No caso das espécies de *Solanum* estudadas, o que se pode discutir não é o aumento ou a perda dos aleloquímicos durante a maturação das folhas e sim uma mudança na composição química destes causando então o efeito diferenciado nos diferentes parâmetros da germinação. Assim, pode-se inferir que o modo de ação dos extratos correspondentes aos dois tipos de folhas seja diferente e que também há diferenças entre as espécies estudadas.

As diferenças encontradas entre as matrizes doadoras quanto ao efeito alelopático são algo pouco discutido na literatura. Além de o fator genético ter sua influência, já que o trabalho foi realizado com espécies nativas sem nenhuma seleção prévia como em plantas cultivadas, os fatores bióticos e abióticos também são bem conhecidos sobre sua influência na biossíntese dos aleloquímicos. Os efeitos dos estresses bióticos, tais como diferentes características do solo, disponibilidade de nutrientes, condições de umidade, disponibilidade de luz, temperatura, são alguns desses fatores importantes (Gowranska & Golisz 2005). Como exemplos de influência de fatores abióticos, têm-se patógenos, herbívoros e a vegetação associada (Pedrol *et al.* 2006). Assim, o conjunto desses fatores pode agir junto com a diversidade genética de uma população nativa, influenciando a resposta diferenciada do efeito alelopático entre matrizes. Com isso, fica evidente a necessidade de realizar coletas de diferentes plantas na tentativa de minimizar o efeito da diversidade genética e ambiental em que as espécies nativas estão expostas e, assim, mostrar de fato um efeito próprio da espécie em estudo.

---

## EFEITO NO CRESCIMENTO DO GERGELIM

O efeito do extrato aquoso de folhas de diferentes idades (jovens e adultas) das três espécies de *Solanum* coletadas em diferentes época do ano (seca e chuvosa) encontram-se nas figuras a seguir e são divididos por espécie.

---

*Solanum lycocarpum*

Na Figura 12.1, tem-se a média de inibição causada pelos extratos oriundos das folhas das 10 diferentes matrizes doadoras em todos os parâmetros analisados. Desta forma fica mais claro o maior efeito inibitório no crescimento da raiz em relação à parte aérea tratado com os diferentes extratos. Além disso, o efeito inibitório do crescimento do gergelim tem uma forte relação dose-dependente da concentração dos extratos.

Os extratos obtidos das folhas coletadas no período de seca produziram maior inibição média, tanto da parte aérea como da parte radicular do gergelim, não havendo muita diferença entre os extratos obtidos de folhas adultas e jovens. O efeito inibitório das folhas coletadas no período chuvoso foram relativamente inferior aos observados no período da seca. A lixiviação dos compostos ativos da folha de lobeira poderia ser uma explicação para essa redução da inibição do crescimento da espécie-alvo.

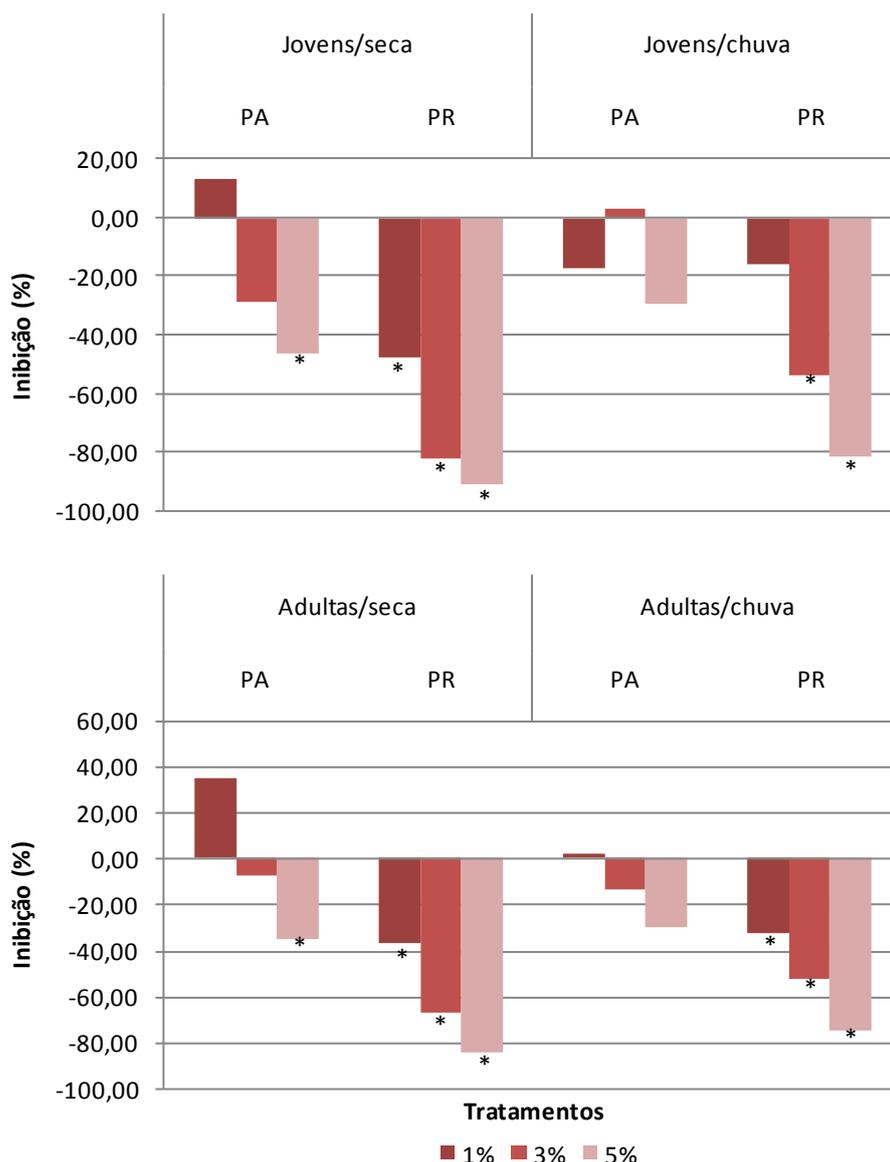


Figura 12.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. lycocarpum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

### *Solanum subumbellatum*

Na Figura 13.1, têm-se as médias de inibição dos extratos de folha coletada das 10 diferentes matrizes doadoras e todos os parâmetros analisados. Desta forma, fica claro que a parte radicular também foi a mais afetada pela presença do extrato da folha de *S. subumbellatum*, independente da época de coleta da folha e sua idade.

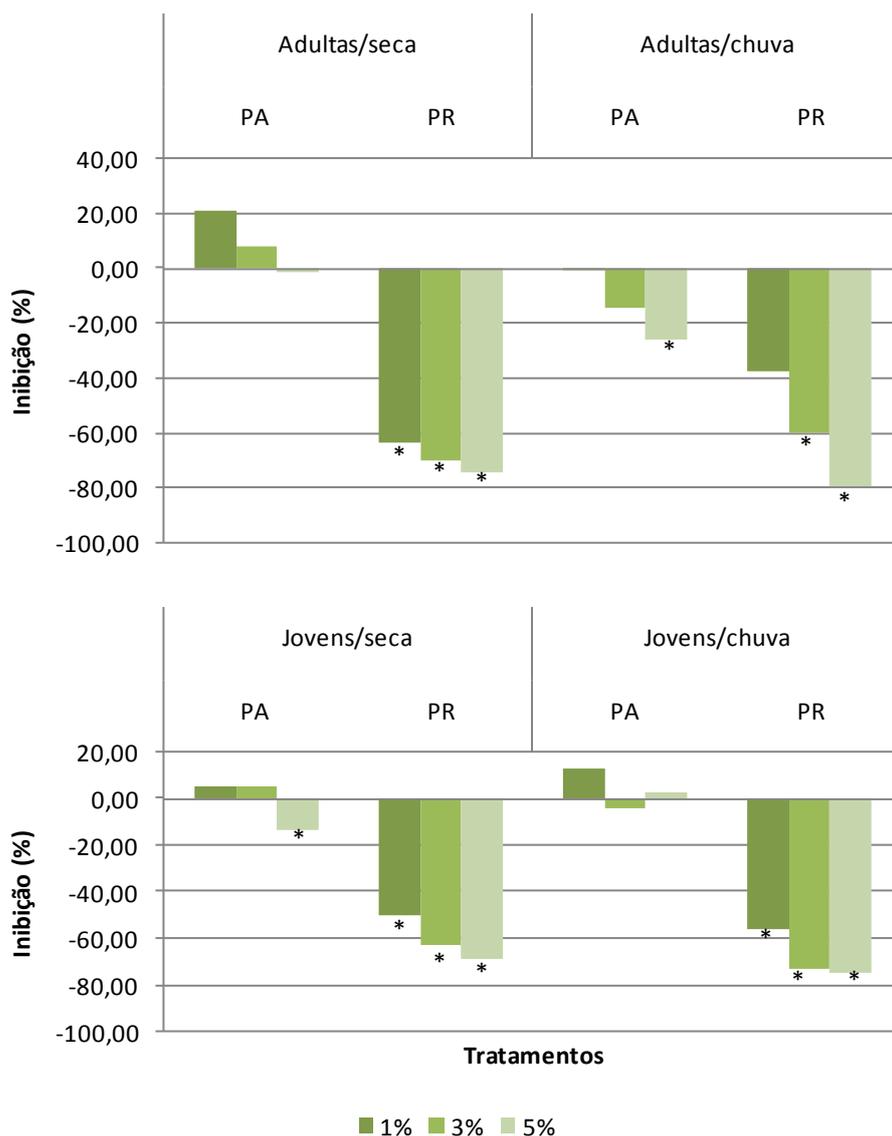


Figura 13.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. subumbellatum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

O comportamento da inibição da parte radicular do gergelim produzido por extratos de folhas coletada na estação de seca chama a atenção pelo fato da atividade não diminuir acentuadamente com a diluição do extrato, tanto para extratos de folhas adultas quanto de folhas jovens. Isso dá indícios de que o princípio ativo presente no extrato aquoso de folhas de *S. subumbellatum*, coletadas na estação seca encontram-se em concentração suficiente para promover a inibição da parte radicular do gergelim, mesmo nas concentrações mais baixas.

---

*Solanum granuloso-leprosum*

Na Figura 14.1, têm-se as médias de inibição da parte aérea e radicular do gergelim tratadas com os diferentes extratos de folha de *S. granuloso-leprosum* originado de 10 diferentes matrizes.

Os extratos das folhas jovens apresentaram maior inibição no crescimento da parte radicular quando coletadas na estação de seca, se comparado com a estação chuvosa, o que não foi observado para o efeito inibitório de folhas adultas, que independente da estação apresentaram o mesmo padrão de inibição. Além da avaliação quantitativa, na Figura 15.1 pode se analisar qualitativamente como se encontravam as plantas de gergelim tratadas com o extrato aquoso das folhas das espécies analisadas. Nesse caso específico, trata-se de extrato aquoso de folhas jovens de *S. granuloso-leprosum*, mas esse padrão de necrose se manteve na grande maioria dos extratos analisados.

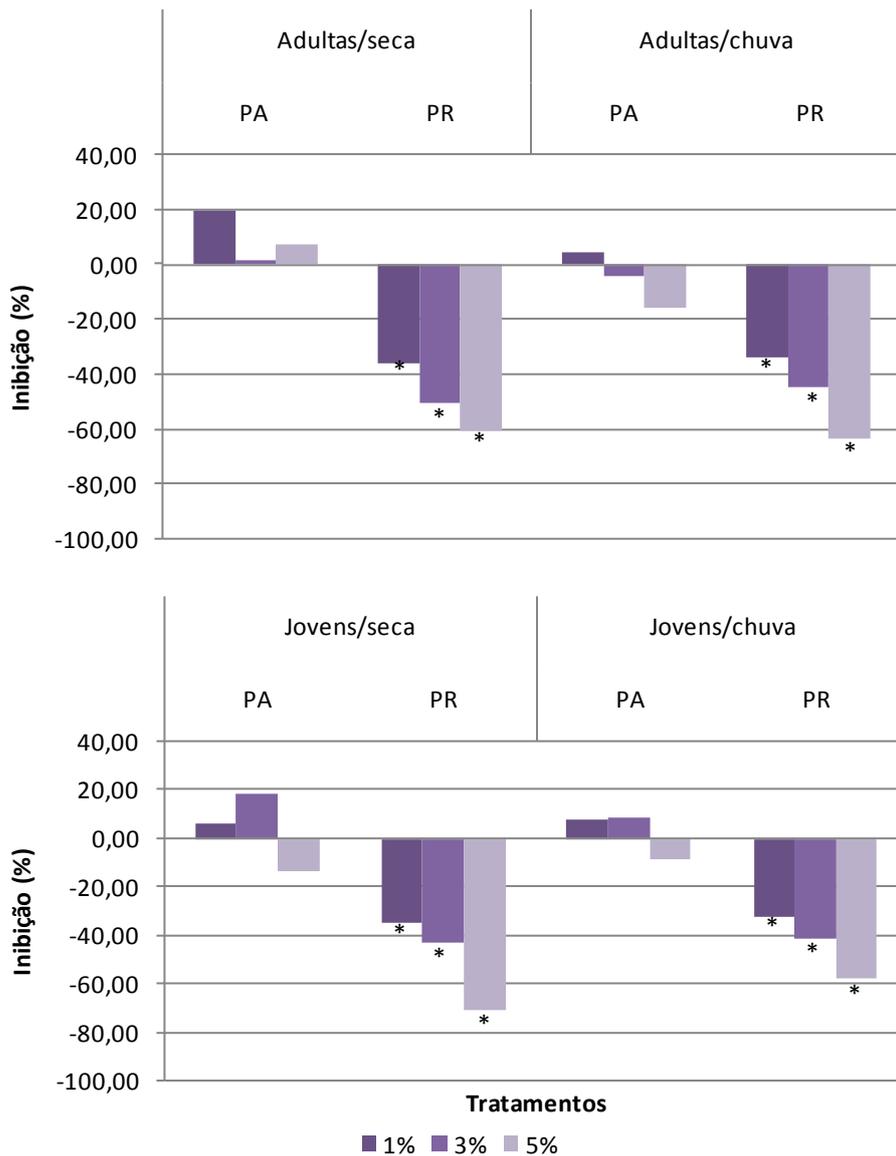


Figura 14.1. Média da porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea (PA) e radicular (PR) do gergelim em relação ao controle, sob influência do extrato aquoso de folhas jovens e adultas de 10 diferentes matrizes doadoras de *S. granuloso-leprosum*, coletadas nas épocas de chuva e seca. \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5%.

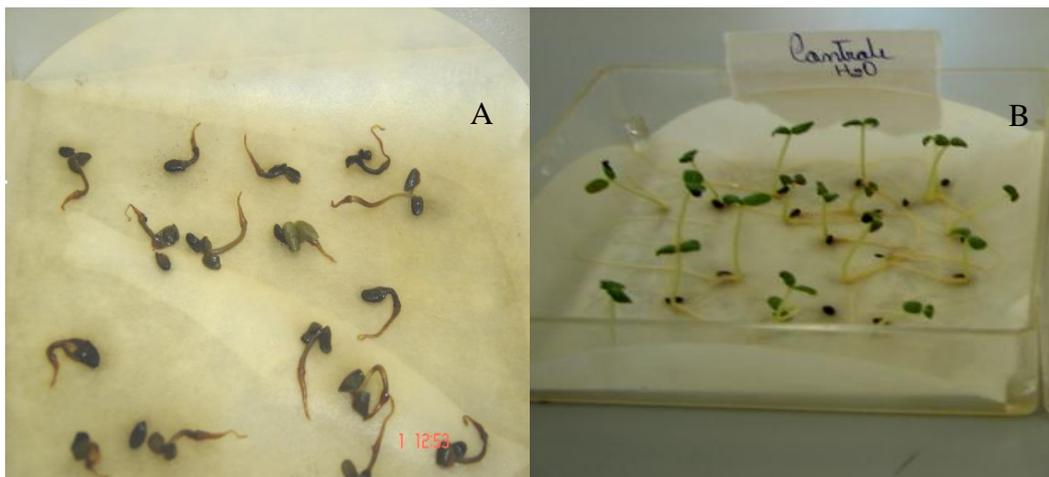


Figura 15.1. Plântulas de gergelim com 7 dias de crescimento, expostas a extrato aquoso de folhas jovens *S. granuloso-leprosum* a 5% (p/v) (A); e o controle crescendo em água destilada (B). Presença de necroses nas plântulas tratadas com extrato e redução do crescimento da radícula.

O fluxograma apresentado na Figura 16.1 indica os principais resultados sobre o efeito dos extratos das espécies de *Solanum* no crescimento do gergelim.

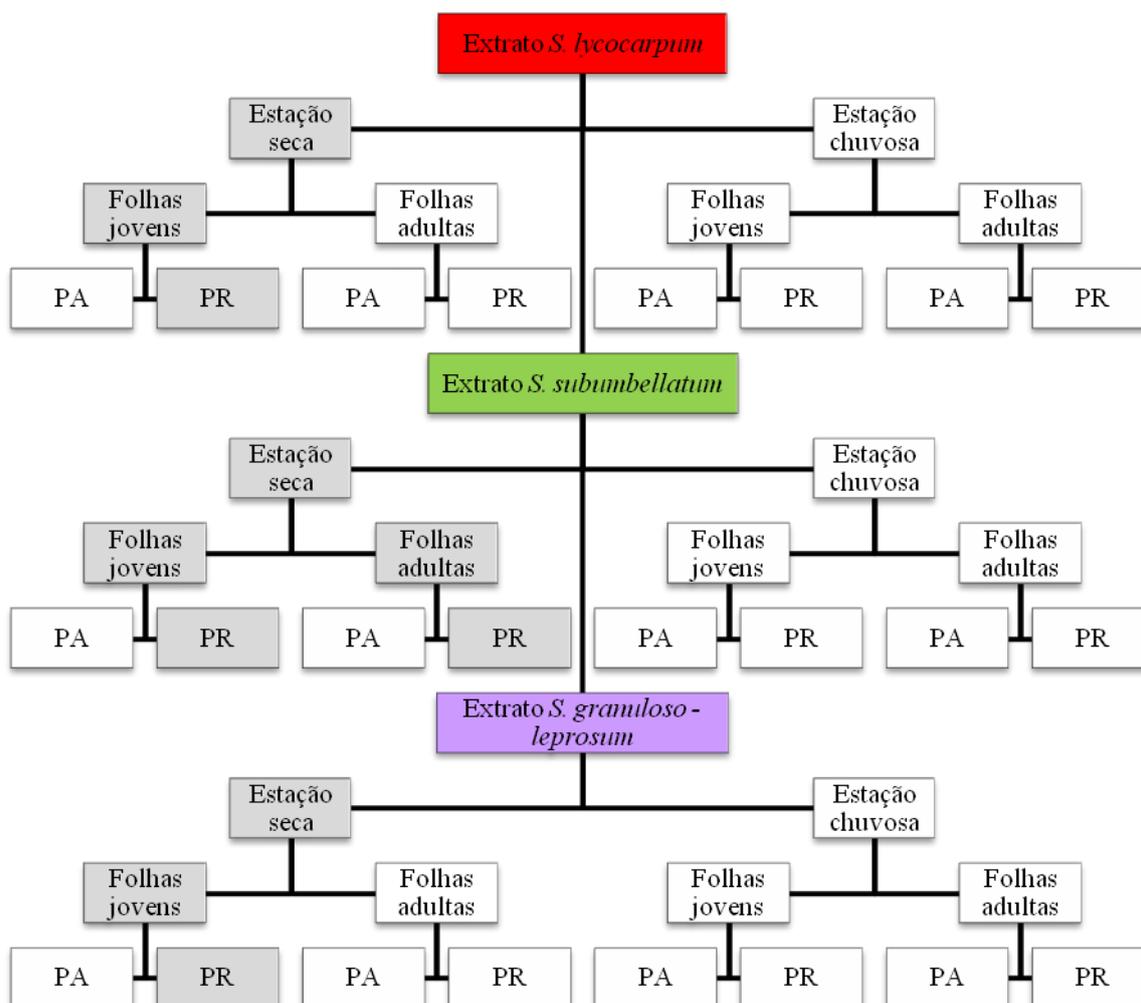


Figura 16.1. Resumo da atividade alelopática inibitória das três espécies de *Solanum* no crescimento da parte aérea (PA) e parte radicular (PR) das plântulas de gergelim, tratadas com extrato de diferentes tipos de folha (jovem e adulta), coletadas em duas épocas do ano (seca e chuva). Áreas coloridas significam maior inibição dos tratamentos em relação ao controle.

Para o efeito no crescimento, foi possível verificar um padrão de inibição do gergelim causado por extrato de folhas jovens coletadas na época de seca, algo que foi variável na germinação. A inibição da parte radicular do gergelim foi a mais afetada pela presença dos aleloquímicos do que a parte aérea em todas as situações.

Correia *et al.* (2005) sugerem que a inibição da radícula por substâncias alelopáticas em experimentos com placa de Petri é sempre maior que a inibição da parte

aérea, uma vez que os aleloquímicos são concentrados e absorvidos pelo tecido radicular, favorecidos pelo contato físico com o papel filtro. A inibição da raiz pode coincidir com o estímulo do crescimento do hipocótilo (parte aérea). Esses efeitos inibitórios e estimulatórios em conjunto podem ser interpretados como resultado da ação direta de alterações moleculares ou como uma re-orientação de crescimento na tentativa de evitar o estresse do aleloquímico (Fernandez *et al.* 2006). Outra hipótese é embasada no trabalho de Pasternak *et al.* (2005) que trabalharam com *Arabidopsis thaliana* e observaram que após a indução a estresse, as plantas apresentavam um aumento da relação parte aérea/parte radicular. Essa mudança foi ocasionada pela influência na homeostase hormonal e consequente inibição do transporte polar de auxina, que são processos que podem estar envolvidos nessa redistribuição do sinal mitótico. Todavia, em alguns casos, alterações moleculares ou respostas fisiológicas específicas podem enfraquecer a arquitetura da raiz, comprometendo a sobrevivência da plântula em longo prazo, ainda mais em ambiente de Cerrado onde, na época de seca, as camadas superficiais do solo secam, diminuindo em muito a probabilidade de sobrevivência das plantas que apresentam algum problema na estrutura e funcionamento do sistema radicular. Desta forma, essas plantas de *Solanum* podem evitar o surgimento de outras espécies na sua vizinhança, através da liberação desses compostos acumulados durante a estação seca, no ambiente, seja por lixiviação ou por decomposição das folhas.

Que a concentração dos aleloquímicos pode variar com a idade do órgão da planta, é algo já alertado por Rice (1974). Tecidos jovens, como as folhas, apresentam menos estrutura física (como espinhos, ligninas, ceras e tricomas) para se protegerem de estresses como herbívoros, por exemplo. Para a espécie *Empetrum hermaphroditum*, o nível de batatasina III era muito maior nos tecidos jovens e diminuía com a maturação do órgão, atingindo outro pico em folhas senescentes. No primeiro caso, a batatasina III protegia as folhas contra o ataque de herbívoros e, no segundo caso, esse composto era disponibilizado no ambiente, causando assim o efeito alelopático (Wallstedt *et al.* 1997). Neste trabalho, não foi avaliado o efeito alelopático de folhas senescentes, mas pode-se levantar a discussão sobre o papel dos aleloquímicos em folhas jovens exercerem tanto um possível efeito alelopático, como também protegerem as folhas contra ataques externos, já que os produtos secundários apresentam múltiplas funções (Hadacek 2002; Taiz & Zeiger 2004). Sendo assim, as folhas jovens avaliadas nas três

espécies de *Solanum* apresentam um maior efeito como também observado para *Pinus* (Fernandez *et al.* 2006) e *Alliaria petiolata* (Cipollini & Gruner 2007).

Embora não existam plantas em condições de campo que não estejam submetidas a vários estresses como U.V, temperatura etc, sendo assim o estresse é o fator menos previsível e indeterminado em condições de campo. O período de seca no Cerrado foi, nesse experimento, considerado como um período de estresse para as plantas analisadas. Estresse causado pela perda da água nas camadas superficiais do solo, a baixa umidade relativa e a alta incidência luminosa nessa época. Quando as condições ambientais para o crescimento de uma planta se tornam estressantes, o conteúdo de aleloquímicos nas plantas aumenta dramaticamente. Esse fenômeno junto com a produção periódica dos aleloquímicos pode ser visto como uma resposta do sistema de defesa químico da planta ao estresse (An *et al.* 2003).

Além disso, ambientes em condições estressantes podem restringir o crescimento da planta e a taxa fotossintética, com isso acumular carboidratos não-estruturais. Esse acúmulo justificaria o aumento de substâncias defensivas à base de carbono, que são os compostos derivados do metabolismo secundário (Chaves & Escudero 1999). Sendo assim, o maior efeito inibitório observado na estação seca do extrato das folhas das três espécies de *Solanum* poderia ser explicado pelos múltiplos estresses que as plantas estariam sofrendo nesse período, ocasionando o aumento do efeito alelopático observado no crescimento do gergelim.

Também é importante ressaltar que, além da influência ambiental, a produção de aleloquímicos é geneticamente regulada e pode haver importante diferença do conteúdo dos aleloquímicos entre os genótipos doadores. Esse fato já foi verificado para plantas forrageiras (Miller 1996), para duas espécies de trigo (Quader *et al.* 2001; Wu *et al.* 2007) e para sorgo (Correia *et al.* 2005). Estudos mostrando o efeito da variabilidade genética de espécies nativas e sua influência no efeito alelopático não foram encontrados nas buscas realizadas. Os testes aqui realizados por matrizes chamam a atenção para essa variação do efeito inibitório dos extratos dentro da mesma espécie e por isso se optou em realizar coleta de várias matrizes da mesma espécie. Novamente, mais um fator a ser acrescentado quando se realiza um estudo da alelopatia de uma espécie é a diversidade genética, além dos estresses e idade do órgão, como foi discutido acima.

Assim, concluiu-se que os múltiplos fatores que podem interferir no efeito alelopático de uma espécie tornam-se um desafio ao estudo dessa nova área da ecofisiologia. Compreender um pouco mais desses mecanismos é ferramenta importante no estudo da dinâmica dessas espécies no ambiente natural e o papel que elas desenvolvem no ambiente onde ocorrem. Sua influência dentro da população e dentro da comunidade também é um fator dinâmico e a alelopatia exerce sua influência diretamente e não pode ser ignorado nos estudos de levantamento florístico e na revegetação de uma nova área. Primeiro, porque muitas vezes a alta frequência de uma espécie em uma região pode ter influência da alelopatia, favorecendo ou dificultando o estabelecimento das mesmas. Segundo, por que em um ambiente alterado, as espécies que normalmente ocupam o primeiro estágio de sucessão apresentam efeito alelopático, na tentativa de garantir o seu espaço e diminuir a competição com outras espécies. As espécies de *Solanum* aqui estudadas são muito frequentes em áreas perturbadas do Cerrado e, consideradas por agricultores, como plantas invasoras. Ou seja, a agressividade dessas espécies de colonizarem uma nova área pode também ter um papel direto da alelopatia nesse processo.

## CONCLUSÕES

1. As espécies de *Solanum* estudadas apresentaram efeito alelopático influenciado pelos fatores abióticos (seca e chuva) e pela idade do órgão (folhas jovens e adultas), bem como a variabilidade entre as espécies.
2. O efeito do extrato aquoso de folhas coletados na época da chuva foi mais pronunciado nos parâmetros da germinação para *S. granuloso-leprosum* e *S. subumbellatum* e o efeito dos extratos de folhas coletadas na época de seca foram mais ativos para os extratos de folha de *S. lycocarpum*;
3. Os extratos aquosos da folhas jovens e adultas tiveram modo de ação diferentes dentro da germinabilidade e tempo médio;
4. O estresse causado no período de seca afetou diretamente a presença de aleloquímico nas folhas das espécies estudadas reduzindo o crescimento do gergelim.
5. A parte radicular foi o órgão mais afetado pela presença dos extratos e a parte aérea, nas concentrações mais baixas, sofreu estímulo no seu crescimento;

6. As folhas jovens apresentaram maior efeito inibitório no crescimento do gergelim do que as folhas adultas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, M., Liu, D., Johnson, I., & Lovett, J. (2003). Mathematical modelling of allelopathy: II. The dynamics of allelochemicals from living plants in the environment. *Ecological Models*, 161:53-66.
- Blanco, J. (2007). The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecological Modelling*, 209(2-4):65-77.
- Chaves, N., & Escudeo, C. (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In Inderjit, K. Dakchini, & C. Foy, *Principles and Practices in Plant Ecology-Allelochemical Interaction*. (p. 551). Washington, D.C.: ACS Symposium Series 582, American Chemical Society.
- Chou, C. H. (1999). Role of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Review in Plant Sciences*, 18:609-636.
- Cipollini, D., & Gruner, B. (2007). Cyanide in the chemical arsenal of garlic mustard, *Alliaria petiolata*. *Journal of Chemical Ecology*, 33:85-94.
- Copaja, S., Nicol, D., & Wratten, S. (1999). Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination. *Phytochemistry*, 50:17-24.
- Correia, N., Centurion, M., & Alves, P. (2005). Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. *Ciência Rural*, 35 (3), pp. 498-503.
- Dakshini, K., Foy, C., & Inderjit. (1999). Allelopathy: on component in a multifaceted approach to ecology. In D. Inderjit, & C. Foy, *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions* (pp. 3-14). Washington: CRC Press.
- Dayan, F. (2006). Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. *Planta*, 224, pp. 339-346.

- del Moral, R. (1972). On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia*, 9, pp. 289-300.
- Eich, E. (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites*. Berlin: Springer.
- Feeny, P. (1970). Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51:565-581.
- Fernandez, C., Lelong, B., Vila, B., Mévy, J.-P., Robles, C., Greff, S., et al. (2006). Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an experimental approach. *Chemoecology*, 16:97-105.
- Ferreira, A. (2004). Interferência: competição e alelopatia. In A. Ferreira, & F. Borghetti, *Germinação do básico ao aplicado* (pp. 251-262). Porto Alegre: Artmed.
- Ferreira, A., & Borghetti, F. (2004). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed.
- Gatti, A. B., Perez, S. C., & Lima, M. I. (2004). Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. . *Acta Botanica Brasilica*, 18(3):459-472.
- Gawronska, H., & Golisz, A. (2006). Allelopathy and biotic stresses. In M. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (pp. 211-228). Netherlands: Springer.
- Giotto, A., Oliveira, S., & Silva, J. (2007). Efeito do extrato de folhas de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociência*, 5(2):600-602.
- Gniazdowska, A., & Bogatek, R. (2005). Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologia Plantarum*, 27(3B):395-407.
- Gorla, C. P. & Perez, S.C.J.G.A.(1997). Influência do extrato aquoso de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2):261-266.

- Hadacek, F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4):273-322.
- Haridasan, M. (2000). Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(1):54-64.
- Hoballah, M., Kollner, T., Degenhardt, J., & Turlings, C. (2004). Costs of induced volatile production in maize. *Oikos*, 105:168-180.
- Inderjit, & Asakawa, C. (2001). Nature of interference potential of hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) to radish (*Raphanus sativus* L.): does allelopathy play any role? *Crop Protection*, 20(3):261-265.
- Inderjit, & Duke, S. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217:529-539.
- Jacobi, U., & Ferreira, A. (1991). Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26 (7), p. 935-943.
- Jefferson, L., & Pennachio, M. (2005). Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. *Journal of Arid Environments*, 55:275-285.
- Kainulainen, P., Oksanen, J., Palomaki, V., Hokopainen, J., & Hokopainen, T. (1992). Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany*, 70:1613-1616.
- Karageorgou, P., Levizou, E., & Manetas, Y. (2002). The influence of drought, shade and availability of mineral nutrients on exudates phenolics of *Dittrichia viscosa*. *Flora*, 197:285-289.
- Kato-Noguchi, H., & Ino, T. (2005). Possible involvement of momilactone B in rice Allelopathy. *Journal of Plant Physiology*, 162, pp. 718-721.
- Klink, C., & Machado, R. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1:147-155.
- Marchi, G., Marchi, E., Wang, G., & Mcgiffen, M. (2008). Effect of age of a sorgum-sudangrass hybrid on its allelopathic action. *Planta Daninha*, 26(4):707-716.

- Mauffette, Y., & Oechel, W. (1989). Seasonal variation of leaf chemistry of the coast live oak moth *Phryganidia californica* and implications for the California oak moth *Phryganidia californica*. *Oecologia*, 79:439-445.
- Miller, D. (1996). Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal*, 88:854-859.
- Nilsson, M.-C., & Zackrisson, O. (1992). Inhibition of Scots pine seedling establishment by *Empetrum hermaphroditum*. *Journal of Chemical Ecology*, 18:1857-1870.
- Nilsson, M.-C., Gallet, C., & Wallstedt, A. (1998). Temporal variability of phenolics and batatasin-III in *Empetrum hermaphroditum* leaves over an eight-year period: interpretations of ecological function. *Oikos*, 81:6-16.
- Oliveira, S.C.C. (2003). Alelopatia em *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae). Universidade de Brasília, Departamento de Botânica. 78p.
- Oliveira, S. C.C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004). Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botanica Brasílica*, 18(3):401-406.
- Pasternak, T., Rudas, V., & Jansen, M. (2005). Morphogenetic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedling. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3):299-314.
- Pedrol, N., Gonzáles, L., & Reigosa, M. (2006). Allelopathy and abiotic stress. In M. Reigosa, N. Pedrol, & L. Gonzáles, *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* (pp. 171-209). Netherlands: Springer.
- Periotto, F.; Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S. (2004). Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasílica*, 18(3):425-430.
- Povh, J., Pinto, D., Corrêa, M., & Ono, E. (2007). Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociência*, 5(2):447-449.

- Prado, C., Wenhui, Z., Rojas, M., & Souza, G. (2004). Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1):7-16.
- Quader, M., Daggard, G., Barrow, R., Walker, S., & Sutherland, M. (2001). Allelopathy, DIMBOA production and genetic variability in accessions of *Triticum speltoides*. *Journal of Chemical Ecology*, 27:747-760.
- Reinhardt, C., Van der Laan, M., Belz, R., Hurle, K., & Foxcroft, L. (2006). Production dynamics of the allelochemicals parthenin in leaves of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Plant Diseases and Protection*, XX:427-433.
- Rice, E. (1974). *Allelopathy*. New York: Academic Press.
- Richardson, M., & Bacon, C. (1993). Cyclic hydroxamic acid accumulation in corn seedlings exposed to reduce water potentials before, during, and after germination. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 1613-1624.
- Rodrigues, V., & Carvalho, D. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio Grande-Minas Gerais. *Ciência Agrotecnologia*, 25(1):102-123.
- Rozete, F., Oliveira, P., Gusman, G., Valentim, J., Vestena, S., & Bittencourt, A. (2007). Avaliação do efeito alelopático de extratos aquosos de *Bacharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleraceae* L. *Revista Brasileira de Biociência*, 5(2):513-515.
- Santos, M., & Innecco, R. (2003). Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Revista Ciência Agronômica*, 34(1):5-11.
- Silva, J., Silva, D., Junqueira, N., & Andrade, L. (1994). *Frutas nativas do cerrado*. Brasília: EMBRAPA-CPAC.
- Silva, S. (1996). *Gênero Solanum (Solanaceae) no Distrito Federal, Brasil*. Universidade de Brasília: Departamento de Botânica.
- Sousa, F., Denardin, R., Moura, N., & Dreves, S. (2007). Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. *Allelopathy Journal*, 20(1):195-202.

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. Artmed.
- Tongam, S., Kobayashi, K., & Usui, K. (2001). Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.)A.Gray) in soil under natural field conditions and different moisture conditions. *Weed Biological Management*, 1:115.119.
- Wallstedt, A., Nilsson, M.-C., Odham, G., & Zackrisson, O. (1997). A method to quantify the allelopathic compound batatasin-III in extracts from *Empetrum hermaphroditum* using gas chromatography: applied on extracts from leaves of different ages. *Journal of Chemical Ecology*, 23(10):2345-2355.
- Wu, H., Pratley, J., Lemrle, D., & Liu, M. (2007). Autotoxicity of wheat (*Triticum aestivum* L.) as determined by laboratory bioassays. *Plant Soil*, 296:85-93.

# Capítulo 2

**Isolamento biodirigido de compostos  
alelopático de folhas de espécies de  
*Solanum* (Solanaceae)**

## ISOLAMENTO BIODIRIGIDO DE COMPOSTOS ALELOPÁTICOS DE FOLHAS DE ESPÉCIES DE *SOLANUM* (SOLANACEAE)

**RESUMO:** Bioensaio é uma ferramenta importante no estudo da alelopatia e serve de orientação no isolamento dos produtos fitotóxicos presentes em extratos de planta. O objetivo desse trabalho foi realizar um isolamento biodirigido de compostos presentes em extrato de folhas jovens e adultas de quatro espécies de *Solanum* (*S.lycocarpum*, *S. paniculatum*, *S. subumbellatum* e *S. granuloso-leprosum*). As substâncias presentes em folhas jovens e adultas das espécies estudadas foram extraídas inicialmente com um solvente orgânico de baixa polaridade (diclorometano) seguido por um de alta polaridade (metanol). Esses extratos tiveram sua atividade fitotóxica avaliada no crescimento de coleóptilo estiolado de trigo, nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Em seguida, foi avaliada a porcentagem de inibição de cada um dos extratos e o extrato de diclorometano de *S. granuloso-leprosum* foi eleito para seguir a purificação. Esse extrato foi fracionado em coluna cromatográfica e submetido novamente à avaliação em bioensaio de coleóptilo. Das frações testadas, três foram purificadas em CLAE e seus produtos identificados em RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Foram isolados o carotenóide luteína e também uma lactona sesquiterpênica chamada loliolida. A primeira é precursora de vários compostos alelopáticos e a segunda tem atividade conhecida como aleloquímico.

**Palavras-chave:** coleóptilo de trigo, bioensaio, luteína, loliolida, isolamento.

**ABSTRACT:** Bioassay is an important tool in the study of allelopathy and serves as a guideline in the isolation of phytotoxic products present in plant extracts. The aim of this study was a biodirected isolation of compounds present in extracts of young and mature leaves of four species of *Solanum* (*S.lycocarpum*, *S. paniculatum*, *S. subumbellatum* and, *S. granuloso-leprosum*). The young and mature leaves of the species studied were initially extracted with a solvent of low polarity (dichloromethane) followed by high polarity one (methanol). These extracts had their phytotoxicity evaluated on the growth of etiolated wheat coleoptile at concentrations of 800, 400 and 200 ppm. Then we evaluated the percentage of inhibition of each of the extracts and the dichloromethane extract of *S. granuloso-leprosum* was elected to continue the purification. This extract was fractionated on a column and resubmitted for assessment of coleoptile bioassay of the fractions tested, three were purified on HPLC and their products identified by NMR<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C. It was found a carotenoid called lutein and also a sesquiterpene lactone called loliolide. The first is the precursor of several allelopathic compounds and the second has a known activity as allelochemicals.

**Key words:** wheat coleoptiles, bioassay, lutein, loliolide, isolation.

## INTRODUÇÃO

A alelopatia, dentro da definição aceita pela Sociedade Internacional de Alelopatia, é um processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencia o crescimento e desenvolvimento dos sistemas biológicos (IAS, 1996). Essa definição considera todas as interações bioquímicas entre sistemas vivos, na qual plantas, algas, bactérias e fungos são incluídos, e seu meio ambiente.

O estudo dos produtos naturais oferece, virtualmente, uma infinita fonte de estruturas químicas com potencial para utilização na farmacologia, agronomia e outros campos do conhecimento humano. Entre a ampla variedade de efeito biológico que esses compostos químicos de origem natural podem oferecer, um especial interesse é focado nos metabólitos secundários, nos quais apresentam um importante papel na comunicação química entre organismos (Macías *et al.* 2008). Muitos metabólitos secundários têm sido descobertos, e um grande número tem sido avaliado quanto à sua atividade fitotóxica com a finalidade do desenvolvimento de pesticidas bio-rationais, sendo uma das áreas da alelopatia mais promissoras atualmente (Macías *et al.* 2001).

O aprimoramento de técnicas analíticas e de bioensaios foram ferramentas importantes para detecção e compreensão dos fenômenos fitotóxicos. O desenvolvimento da alelopatia como ciência tem um forte paralelo com o avanço das técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural (Mallik 2000), especialmente com a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A primeira permitiu o isolamento e purificação dos compostos em pequenas quantidades e o segundo, juntamente com a espectrometria de massa e o infravermelho, tem permitido a identificação de muitos aleloquímicos conhecidos atualmente (Macías *et al.* 2008)

A caracterização da atividade dos produtos alelopáticos é possível através de bioensaios ou ensaios biológicos. Bioensaio pode ser definido como: “o uso de material biológico que serve para avaliar a atividade relativa de uma substância, comparada com outro padrão de atividade conhecida” (Webster, 1980). Os bioensaios constituem um procedimento indispensável na alelopatia e são necessários para avaliação do potencial

alelopático de espécies vegetais e, em seguida, da bioatividade durante todas as etapas do estudo: extração, purificação e identificação dos compostos supostamente alelopáticos (Macías *et al.* 1997).

Na busca de novos aleloquímicos, alguns métodos podem ser usados para pesquisar os novos compostos fitotóxicos, tais como o isolamento biodirigido. Este método consiste em realizar bioensaios em cada uma das etapas de isolamento, determinando a (s) fração (ões) testada (s) que apresenta (m) maior atividade biológica. A fração mais ativa é fracionada novamente até a purificação e identificação dos compostos aí presentes, responsáveis pela atividade detectada (Macías *et al.* 2000a).

O gênero *Solanum* (Solanaceae) apresenta várias espécies com potencial para estudos de alelopatia. Oliveira *et al.* (2004) observaram efeito alelopático no extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum*) espécie comum em áreas perturbadas do Cerrado. Tajuddin *et al.* (2002) registraram alelopatia em *Solanum forskalii*, uma erva típica do Paquistão, que inibiu a germinação e crescimento de três tipos de mostarda. Smith *et al.* (1990) verificaram que *Solanum elaeagnifolium* interferiu no crescimento de algodão e Frank (1990) verificou que *Solanum carolinense* danificou plantas de feijão. Outras espécies de *Solanum* como *S. lyratum* (Ye *et al.* 2001), *S. criticum* (Alves *et al.* 2003) e *S. aruno* (Fukuhara *et al.* 2004) também apresentaram efeito fitotóxico e os compostos secundários responsáveis por esse efeito foram os esteróides e alcalóides glicosilados.

Estas espécies apresentam uma grande diversidade de compostos químicos como: flavonas e flavonóides em várias espécies de *Solanum* (Silva *et al.* 2003), além de vários hidrocarbonetos, terpenos e ácidos graxos em *S. pseudocapiscum* (Aliero *et al.* 2006) e saponinas esteroidais em *S. nigrum* (Zhou *et al.* 2006), bem como alguns alcalóides como solamargina e solasodina em *S. tuberosum* (Güntner *et al.* 1997), sendo esse último de grande interesse comercial para a produção de medicamentos. No Cerrado da região do Distrito Federal, foram encontradas 22 espécies desse gênero distribuídas nos diferentes habitat e hábitos (Silva 1996).

Na busca de novos compostos alelopáticos presentes nesse gênero, o objetivo desse trabalho foi analisar a atividade fitotóxica de folhas de quatro espécies de *Solanum*, presentes no Distrito Federal, no desenvolvimento de coleoptilo de trigo e

realizar o isolamento biodirigido de compostos na espécie que apresentou maior atividade alelopática.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA DAS FOLHAS DE *SOLANUM*

As folhas das 4 espécies de *Solanum* (*Solanum granuloso-leprosum* Dunal, *S. subumbellatum* Roem. & Schult., *S. paniculatum* L. e *S. lycocarpum* A. St. Hil.) foram coletadas no mês de novembro de 2007, na Fazenda Sucupira/EMBRAPA em Brasília-DF, nas coordenadas S15°55'41,8'' W 048°01'47,3' Brasília-Brasil. Durante a coleta as folhas foram colocadas em sacos de papel e separadas por idade: folhas jovens (acima do segundo nó de cada ramo) e adultas (abaixo do segundo nó de cada ramo). Estas foram secas em estufa de circulação forçada até peso constante a 50 °C e, em seguida, trituradas com auxílio de um liquidificador, produzindo um pó que foi embalado a vácuo até seu processamento no Laboratório de Alelopatía na Universidade de Cádiz, Espanha.

### PREPARO DOS EXTRATOS DAS QUATRO ESPÉCIES DE *SOLANUM*

Inicialmente, foram preparados extratos de diclorometano (baixa polaridade) e de metanol (alta polaridade), a partir de 2 g de pó de folhas de diferentes idades, de 4 espécies de *Solanum* em uma proporção de 1:10. O pó das folhas, juntamente com o solvente, foi colocado em frascos de vidro fechados e extraído com auxílio de um ultrassom durante 1 hora. Após esse período, esse material foi filtrado e evaporado em rotavapor. A atividade geral desses extratos em coleóptilo estiolado de trigo (descrição abaixo) foi testada e também foram realizados estudos por placa cromatográficas de camada delgada (CCD) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN<sup>1</sup>H 400 MHz) dos extratos brutos, para comparação entre as diferentes espécies e idades das folhas. No fluxograma representado na Figura 1.2 estão descritas essas etapas.

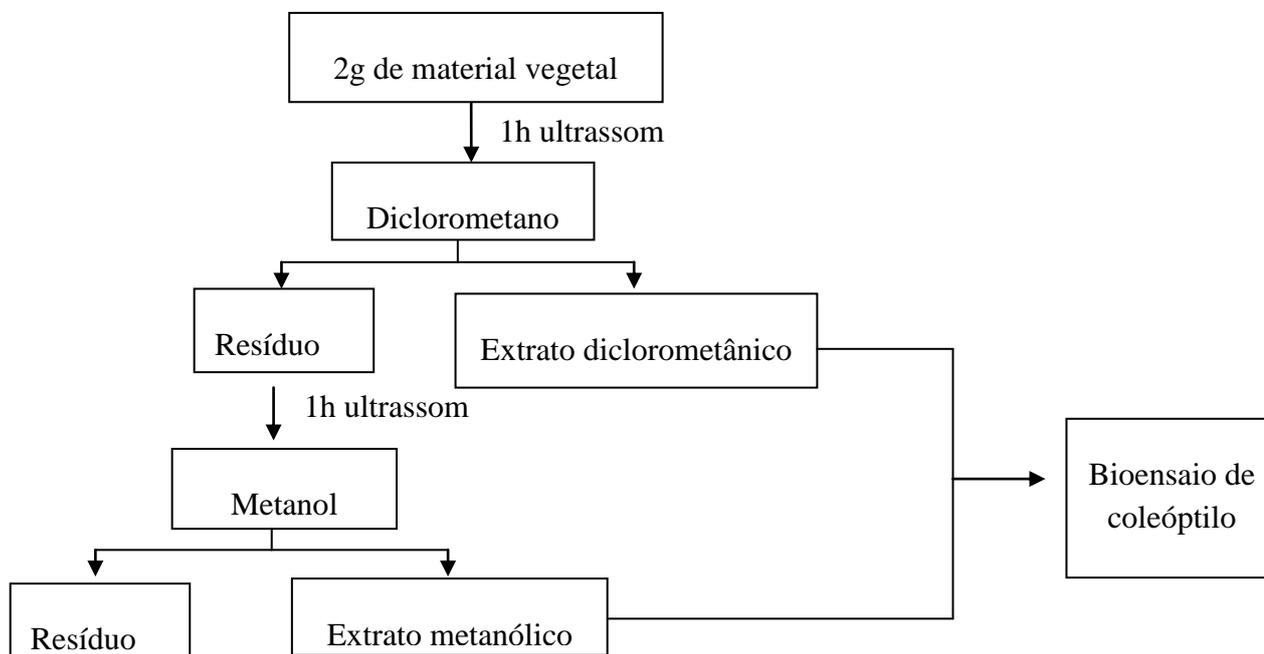


Figura 1.2. Fluxograma mostrando as etapas de preparação dos extratos diclorometânico e metanólico das quatro espécies de *Solanum* avaliadas.

## BIOENSAIO DE COLEÓPTILO

Foram utilizados coleóptilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L.) da variedade Cortez que cresceram durante 5 dias na ausência de luz. Cem sementes de trigo foram umedecidas com 15 mL de água destilada e colocadas em câmara de crescimento, a 25 °C. Depois desse período, sob luz verde, foram extraídos fragmentos de 4 mm de comprimento a partir do epicótilo, com auxílio de lâminas de corte. Os coleóptilos foram incubados em uma solução tampão de crescimento que mantinha o pH constante, nas condições de crescimento. Essa solução era composta de ácidos cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,6. Foram preparadas soluções nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm dos extratos a serem testados nessa solução tampão. Os extratos apresentavam dificuldades de se dissolverem na solução tampão de

crescimento e, para isso, utilizou-se dimetilssulfoxido (DMSO), na proporção de 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , que facilitou a solubilidade dos extratos em água. Os testes foram feitos com 5 fragmentos de coleóptilo por tubo de ensaio que continha 2 mL de solução e cada tratamento foi realizado em triplicata. O controle negativo foi feito apenas com solução tampão e DMSO e o controle positivo com herbicida LOGRAN<sup>®</sup>, comercializado pela empresa SYNGENTA. Os tubos foram dispostos em um rotor na horizontal e com giro contínuo, com rotação de 6 rpm, com ausência de luz. Após 24 horas, os fragmentos eram então retirados, dispostos em uma planilha e fotografados para serem medidos com auxílio do programa Photomed<sup>®</sup> (Figura 2.2). As medidas foram comparadas com o controle negativo e analisadas em porcentagem de inibição.

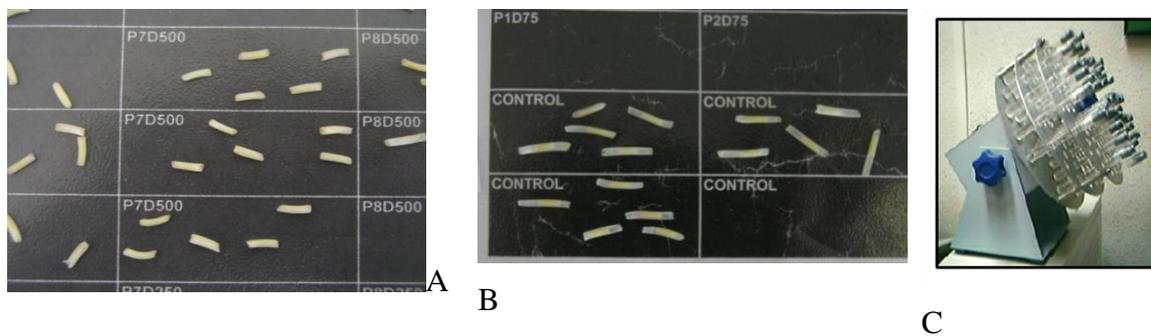


Figura 2.2. Fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo após 24h de bioensaio. (A) efeito do herbicida comercial Logran<sup>®</sup> no desenvolvimento dos coleóptilos e (B) o controle que cresceu somente com solução tampão e (C) o rotor onde eram dispostos os tubos com os fragmentos de coleóptilo.

## PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

O extrato mais ativo (o que apresentava inibição  $\geq 50\%$ ) foi submetido a uma separação inicial em coluna cromatográfica de sílica gel Merck (0,06 – 0,2 mm) como fase estacionária, em pressão atmosférica. Foi utilizada como fase móvel diclorometano (DCM) e acetona em diferentes proporções de 0 a 100%, eluindo posteriormente com MeOH. Em seguida, as frações tiveram sua atividade testada em bioensaio de coleóptilo e as mais ativas seguiram para purificação em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. O CLAE utilizado era da marca *MERCK HITACHI*, equipado com canais de detecção L-7490. Os solventes foram impulsionados por bombas de 3 canais *LaChrom* L-7100. Os cromatogramas foram processados mediante um software *MERCK HITACHI* D-7000. Foram utilizadas colunas de fase normal semipreparativas (preenchimento Li Chrospher SiO<sub>2</sub>, Merck, 7 e 10  $\mu\text{m}$ , dimensões 250 x 10 mm) e analíticas (preenchimento Li Chrospher SiO<sub>2</sub>, Merck, 5  $\mu\text{m}$ , dimensões 250 x 4 mm). O fluxo do eluente foi de 3 mL/min para coluna semipreparativa e 1 mL/min para a analítica.

Cromatografia de camada delgada (CCD) foi utilizada durante todo o processo de purificação. As placas tinham 0,25 mm de espessura com indicadores fluorescentes da marca Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> (Machery Ángel). As placas cromatograficas se seguiam por UV (254 e 360 nm) e por reveladores. Os reveladores usados foram *Oleum* (solução de ácido sulfúrico, água e ácido acético 1:4:20) e anisaldeído (solução de etanol, anisaldeído, ácido sulfúrico, ácido acético na proporção 450:25:25:10) e, posteriormente aquecidos a 150 °C.

Os compostos isolados e purificados eram submetidos a análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN<sup>1</sup>H). Os espectros de RMN foram registrados no equipamento *VARIAN INOVA* 400 e utilizados solventes deuterados conforme a solubilidade da amostra. Para a calibração dos deslocamentos químicos,  $\delta$  (expressado em ppm) e a constante de acoplamento foram referenciados em relação ao pico residual dos solventes. Os resultados dos espectros foram então comparados com compostos já descritos na literatura de produtos naturais.

## PROCESSAMENTO DOS DADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para o bioensaio de coleóptilo, as três réplicas foram medidas separadamente para avaliar a média total e o desvio padrão da amostra. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição do alongamento, segundo a fórmula abaixo:

Porcentagem de inibição

$$\%inibição = \left( \frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) - 100\%$$

onde  $\bar{X}T$  é a média de alongamento dos tratamentos e  $\bar{X}C$ , a média de alongamento do controle.

Os resultados são mostrados em um gráfico de barras onde o “0” representa a longitude do controle. Os valores positivos indicam estimulação dos parâmetros medidos e os negativos, inibição dos mesmos. As médias foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas entre si pelo teste de comparação de média Tukey 5%, através do programa estatístico SISVAR<sup>®</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### BIOENSAIO INICIAL COM TODAS AS ESPÉCIES DE *SOLANUM*

O rendimento dos extratos diclorometânico e metanólico obtido do pó das folhas das 4 espécies de *Solanum* estudadas encontra-se na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Rendimento dos extratos diclorometânico e metanólico extraídos do pó da folha de quatro espécies do gênero *Solanum* com diferentes idades (jovens e adultas).

Espécie	Idade da folha	Rendimento (%)	
		Extrato diclorometânico	Extrato metanólico
<i>S. granuloso-leprosum</i>	Jovem	3,38	10,76
	Adulta	4,18	8,07
<i>S. subumbellatum</i>	Jovem	2,63	12,60
	Adulta	17,46	10,52
<i>S. paniculatum</i>	Jovem	1,71	11,13
	Adulta	2,41	11,74
<i>S. lycocarpum</i>	Jovem	0,81	7,09
	Adulta	1,71	9,72

Os extratos metanólicos apresentaram um maior rendimento do que os extratos diclorometânicos para todas as espécies estudadas. Esses extratos após secos foram então preparados para bioensaio em crescimento de coleóptilo de trigo.

Os extratos de diclorometano e metanol de folhas adultas e jovens de *Solanum granuloso-leprosum* e seu efeito no desenvolvimento do coleóptilo de trigo podem ser observados na Figura 3.2. Os extratos de diclorometano, tanto de folhas jovens quanto de folhas adultas, apresentaram comportamento parecidos, uma maior inibição na concentração mais alta (800 ppm) e esta se manteve constante nas concentrações mais baixas. Para o extrato metanólico, se observa uma atividade maior na concentração mais alta e uma resposta dose-dependente da concentração nos dois tipos de folha, além disso

as atividades observadas sempre foram inferiores ao herbicida Logran<sup>®</sup> – controle positivo.

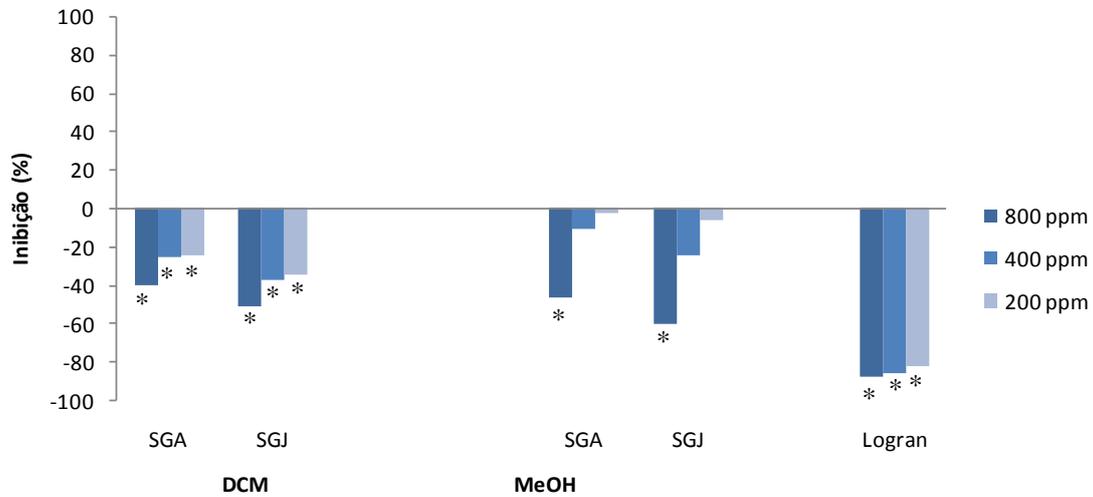


Figura 3.2. Extrato de folhas adultas (SGA) e jovens (SGJ) de *Solanum granulose-leprosum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Na Figura 4.2, tem-se o comportamento do efeito dos extratos de folha de *S. subumbellatum*. Para essa espécie, o extrato de diclorometano mostrou-se mais ativo e sem diferença entre folhas jovens e adultas. O extrato de metanol teve uma atividade menor do que o extrato diclorometânico e uma relação dose-dependente da concentração, sendo as folhas adultas mais ativas que as jovens.

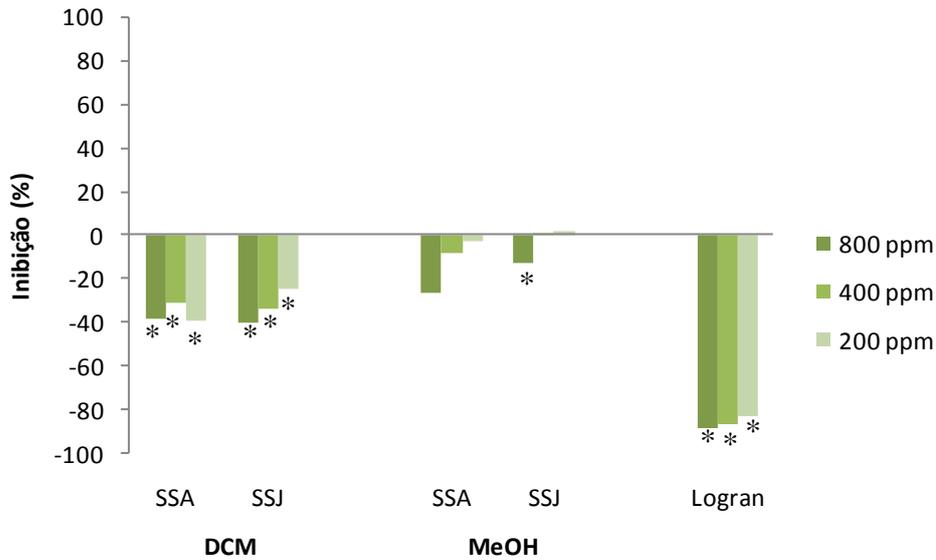


Figura 4.2. Extrato de folhas adultas (SSA) e jovens (SSJ) de *Solanum subumbellatum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleótilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

Para *S. paniculatum*, novamente o extrato diclorometano manteve a atividade de inibição dos coleótilos, mesmo nas concentrações mais baixas, o que não foi observado para o extrato metanólico no qual houve inclusive estímulo no crescimento (Figura 5.2). Entre folhas jovens e adultas, as folhas jovens apresentaram um efeito inibitório maior que as folhas adultas, no extrato diclorometânico.

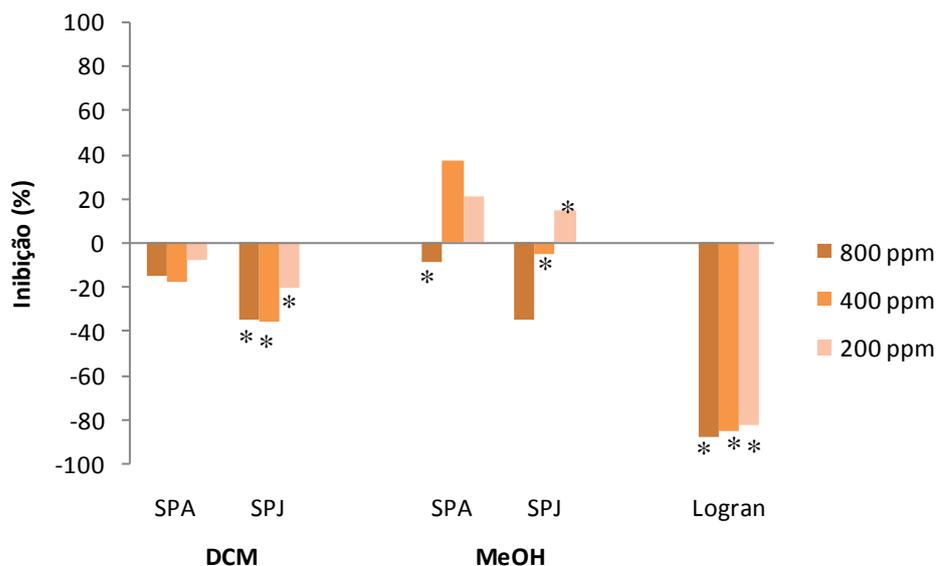


Figura 5.2. Extrato de folhas adultas (SPA) e jovens (SPJ) de *Solanum paniculatum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleóptilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

O extrato obtido de folhas adultas de *S. lycocarpum*, o extrato diclorometânico obteve a maior atividade e esta se manteve nas concentrações mais baixas, o que não foi observado para folhas jovens (Figura 6.2). O extrato metanólico novamente apresentou um efeito dose-dependente da concentração muito evidente, comportamento observado em todos os extratos das espécies estudadas. Embora apresente uma maior inibição na concentração mais alta, essa atividade não se mantém. Novamente, se comparado com o herbicida comercial Logran<sup>®</sup>, nenhum dos extratos de nenhuma das espécies obteve uma inibição similar a este.

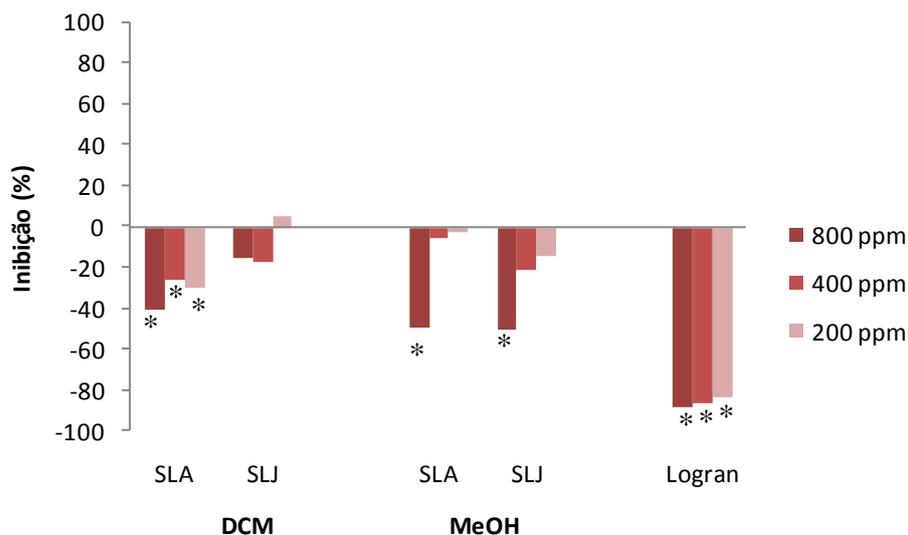


Figura 6.2. Extrato de folhas adultas (SLA) e jovens (SLJ) de *Solanum lycocarpum* a partir de extratos metanólicos (MeOH) e diclorometânico (DCM) e herbicida comercial Logran, e sua influência no desenvolvimento do coleótilo estiolado de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

A escolha dos dois solventes orgânicos utilizados nessa extração preliminar foi para se ter idéia de onde estariam os compostos ativos dessas folhas, em polaridade mais baixa (diclorometano) ou mais alta (metanol). Além do perfil em placa cromatográfica de camada delgada, a análise dos extratos em RMN1H também foi utilizado para comparações entre os diferentes idades das folhas analisadas e a presença de compostos nesses extratos. Esses espectros encontram-se no ANEXO I (extratos diclorometânico página 80 a 87) e ANEXO II (extrato metanólico páginas 88 a 95). Para todas as espécies testadas, o que se sugere é que os compostos mais ativos encontram-se dentro dos extratos de menor polaridade, o diclorometano. De acordo com os resultados obtidos com bioensaio de coleótilo de trigo, o extrato metanólico, embora nas concentrações mais altas demonstre alguma atividade, essa não se mantém nas concentrações mais baixas. Isso pode sugerir a interferência do efeito osmótico desses extratos, já que estes extraem um elevado grau de açúcar das folhas. Wardle *et al.* (1992), analisando o efeito osmótico e alelopático de extratos de gramíneas, concluíram que muitas vezes o efeito alelopático é substancialmente superestimado quando o efeito osmótico ocorre. Maraschin-Silva & Áquila (2006) e Wandscheer &

Pastorini (2008) também mostraram a importância de se avaliar o efeito osmótico em bioensaios alelopáticos.

O fato é que a maioria dos compostos conhecidos para o gênero *Solanum* encontram-se na sua forma glicosilada, como esteróides e alcalóides, e foram extraídos comumente com metanol. Esses resultados sugerem que os principais compostos responsáveis pela atividade fitotóxica das espécies testadas, em crescimento de coleótilo estiolado de trigo, sejam produtos de menor polaridade presentes nos extratos de diclorometano usados nesse experimento.

Dentre a diferença de folhas jovens e adultas, as folhas jovens apresentaram uma atividade maior na maioria das espécies, embora não significativo na maioria dos casos. As folhas jovens ainda carecem de proteção física como espinhos e tricomas e muitas vezes a proteção química é um recurso valioso na proteção dessas das agressões do meio como herbivorias etc. Marchi *et al.* (2008), estudando o efeito alelopático de diferentes idades de sorgo, concluíram que com o aumento da idade o efeito inibitório diminuía, sendo maior no início do estágio de desenvolvimento das plantas. Já no estudo da dinâmica dos aleloquímicos produzidos por *Parthenium hysterophorus* L., observou-se que os conteúdos do produto analisado (partenina) na folha, aumentavam com a idade, tendo o pico antes do início da floração (Reinhardt *et al.* 2006). O livro do Rice (1974), publicação clássica da alelopatia, discute sobre a idade do órgão da planta e a produção de aleloquímico e, para o tabaco, a quantidade de ácido clorogênico diminuiu com a idade da folha.

---

#### PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE *S. granuloso-leprosum*

A espécie *S. granuloso-leprosum* foi eleita para avaliação dos compostos presentes por apresentar uma atividade do extrato de diclorometano satisfatória ( $\geq 50\%$ ). Isso porque a atividade se manteve mesmo nas menores concentrações, fato que não aconteceu com extrato metanólico (Figura 2). Além disso, não houve diferenças significativas de atividade, cromatografia em camada delgada e nem nos espectros de RMN (ANEXO I) entre folhas jovens e adultas e por isso elas foram unidas para a extração aumentando assim a quantidade de material disponível. O volume total de pó de folhas secas foi de 800 g. Essa massa foi extraído inicialmente com hexano na

proporção de 1:10 por 1 hora no ultrassom, a fim de retirar o excesso de gorduras e ceras. Em seguida, a extração com diclorometano se seguiu do mesmo modo. O rendimento desse extrato gerou 16 g de extrato hexânico (2,00% de rendimento) e 13 g de extrato diclorometânico (1,63% de rendimento) que, em seguida, foi fracionado. Esse fracionamento ocorreu em uma coluna de 50 cm de altura por 6 cm de diâmetro e a sílica gel atingia uma altura de 23cm na coluna. O material a ser fracionado foi aplicado na parte superior da coluna e coberto com um pouco de sílica. Em seguida, a mescla de solventes orgânicos diclorometano:acetona, foram acrescentados em polaridade crescente até a lavagem da coluna com metanol. Desse fracionamento, foram recolhidos 65 tubos e estes foram unidos conforme similaridade em CCD originando 8 frações.

Essas 8 frações tiveram novamente sua atividade testada em bioensaio de coleóptilo de trigo e os resultados são mostrados na Figura 7.2.

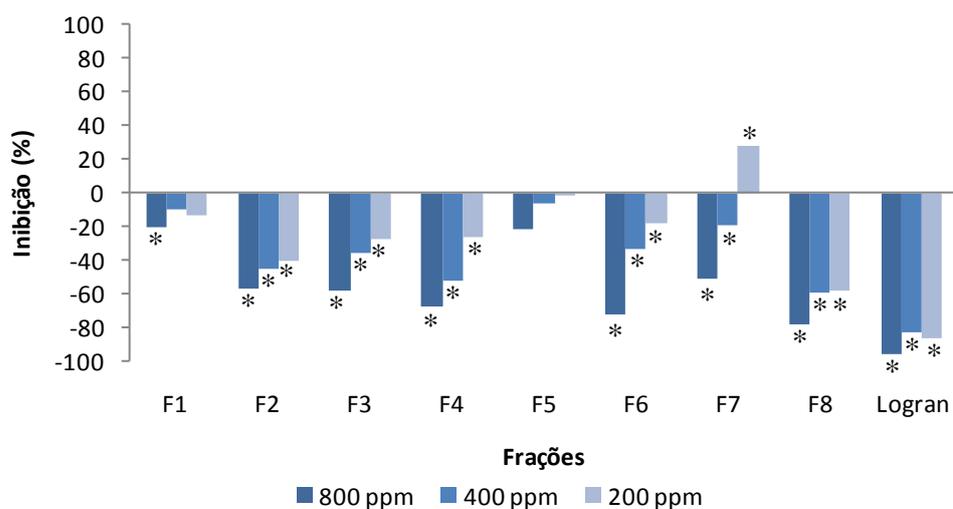


Figura 7.2. Atividade alelopática das frações do extrato de diclorometano do pó da folha de *S. granuloso-leprosum*, no desenvolvimento dos coleóptilos estiolados de trigo. \*Indica diferença estatística em relação ao controle, a  $p < 0,05$ .

O efeito das frações no desenvolvimento do coleóptilo de trigo se mostrou dose-dependente da concentração em todas as frações analisadas. As frações que apresentaram menor atividade foram a F1, F5 e a F7, sendo que essa última até promoveu o crescimento na concentração mais baixa. As frações F3 e F4 apresentaram

um efeito inibitório muito similar e o composto majoritário em placa de CCD era o mesmo, então se optou por unir as duas frações para realizar a identificação do composto ativo, a fim de aumentar a quantidade de produto obtido. A fração F6, em CCD, apresentava dois compostos muito nítidos e aparentemente fáceis de separar, além de uma quantidade em massa suficiente para realizar o isolamento e identificação dos compostos. Por esses motivos além de uma atividade inibitória importante esta também foi eleita para ser uma fração analisada. A fração F8, que apresentou uma das melhores atividades inibitórias, possuía compostos muito polares difíceis de serem separados em fase normal. Uma tentativa de isolar os produtos em fase reversa foi realizada, mas sem êxito e por isso os produtos dessa fração não foram identificados. Um esquema mostrando as frações e os procedimentos adotados encontram-se na Figura 8.2.

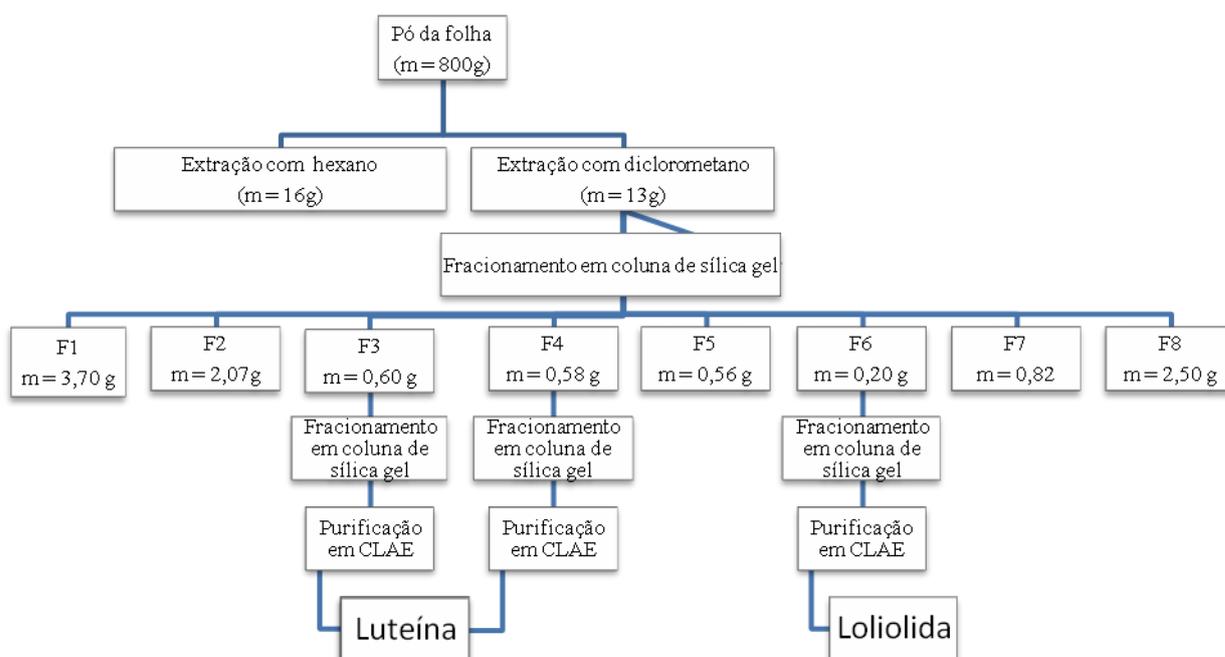


Figura 8.2. Fluxograma mostrando o rendimento das frações do extrato de diclorometano das folhas de *S. granuloso-leprosum*, bem como as frações eleitas para serem purificadas.

O composto isolado em maior quantidade das frações 3 e 4 (F3 e F4) foi a Luteína (P1) (Figura 9.2), identificada a partir do espectro de RMN (Anexo III páginas 97 e 98) e comparada com a bibliografia (Molnár *et al.* 2004).

## Carotenóide

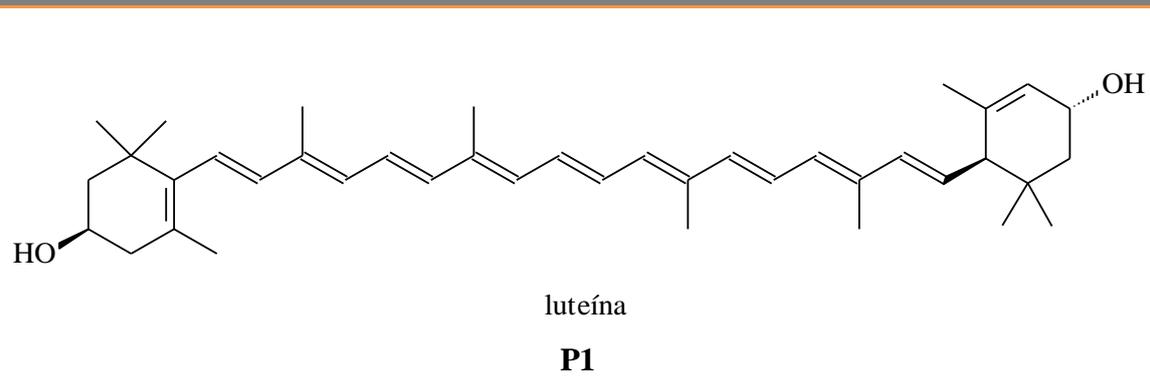


Figura 9.2. Composto isolado das frações F3 e F4 do extrato de diclorometano do pó das folhas de *S. granuloso-leprosum*- o carotenóide Luteína (P1)

A luteína foi obtida a partir do fracionamento em coluna da F3 e F4 (m = 900 mg), com eluente hexano:acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Desse fracionamento, foram obtidas 10 sub-frações agrupadas de acordo com a similaridade em CCD. A sub-fração 8 (70 mg) foi então aplicada em CLAE, em coluna semi-preparativa (LiChrospher SiO<sub>2</sub>, Merck 250 x 10 mm), com eluente hexano:acetato de etila a 40% , sendo obtido 11 mg do produto puro.

Dentro dos grupos funcionais dos compostos secundários, a luteína é um terpeno compostos por 40 carbonos e assim considerado como um tetraterpeno que age como pigmento acessório na fotossíntese e protege os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação. Os terpenos, ou terpenóides, constituem o maior grupo de produtos secundários, são originados a partir da acetil CoA e são formados por unidades de cinco carbonos chamadas unidades isoprênicas (Taiz & Zeiger 2004).

Alguns trabalhos mostram a existência de luteína em espécies do gênero *Solanum* como a que foi encontrada em quantidade expressiva em folhas de *Solanum nigrum* 84-187 mg/100 g de folha seca (Raju *et al.* 2007). Também há relatos da presença desse composto em frutos de *S. quitoense* (Gancel *et al.* 2008) e em tubérculos de *S. phureja* (Griffiths, *et al.* 2007) e em vários frutos de espécies de *Solanum*, seção *Lycopersicon* (Morais 2007). Mas, para *S. granuloso-leprosum*, é a primeira vez que se relata a presença desse composto.

Sobre o papel da luteína na fitotoxicidade em plantas, não há na literatura consultada relatos de sua atuação. O fato de a fração onde ela foi isolada ser uma fração ativa na inibição do crescimento do coleótilo de trigo pode ser devido à presença de outros compostos minoritários porém com alta atividade ou simplesmente um efeito de concentração, pois a luteína era claramente o produto majoritário dessa fração. Mas também não se pode deixar de comentar que muitos compostos alelopáticos importantes, como as strigolactonas (Matusova *et al.* 2005), são originadas a partir da via dos carotenóides e a luteína poderia ser uma fonte importante para origem de compostos com atividade fitotóxica.

Os produtos isolados e identificados da fração 6 (F6) do extrato de diclorometano foi a Loliolida identificada a partir da comparação do espectro de RMN<sup>1</sup>H (ANEXO III) com a literatura (Isoe *et al.* 1971). A estrutura da Loliolida é mostrada na Figura 10.2.

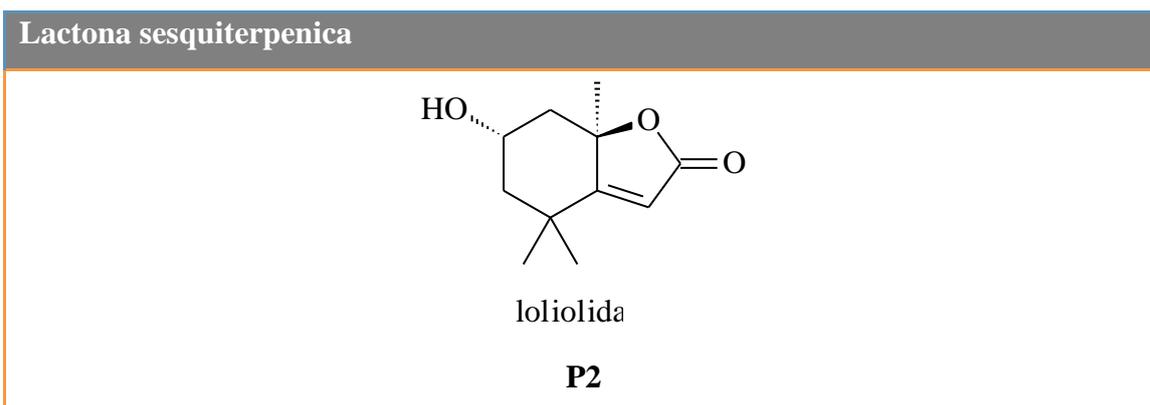


Figura 10.2. Produto extraído da fração F6 do extrato de diclorometano do pó das folhas de *S. granuloso-leprosum*- a loliolida (P2).

Esse produto foi obtido a partir da fração 6 (m = 200 mg) que foi novamente fracionada em coluna de sílica com eluente clorofórmio:metanol, obtendo assim outras 4 sub-frações por similaridade em CCD. A sub-fração 2 (m = 40 mg) foi aplicada em CLAE, em coluna semi-preparativa (LiChrospher SiO<sub>2</sub>, Merck 250 x 10 mm), sendo o eluente hexano:acetato de etila a 60%, obtendo 1,6 mg do produto puro que era um sólido branco.

Um dos primeiros registros do isolamento desse composto foi feito por Hodege & Porte (1964) que o isolou da planta *Lolium perenne* de onde originou o seu nome. É

um composto cuja fórmula é  $C_{11}H_{16}O_3$  (1,3-dihidroxi-3,5,5-trimetilciclohexilideno-4-acético lactona ácida). A Loliolida é uma lactona sesquiterpênica e tem sua origem a partir da degradação dos carotenóides e os dados espectroscópicos encontrados para a amostra em estudo conferem com os da literatura (Isoe *et al.* 1971). É uma classe de composto amplamente distribuída nas plantas. Mais de 7000 estruturas diferentes desta classe já foram descritas (Fraga 2005).

A atividade alelopática desse composto já foi testada na germinação e crescimento de *Echinochloa crus-galli*. Os resultados de atividades, nas concentrações que variavam de 1000  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , foram estimulatórios para o desenvolvimento da parte aérea, inibição de no máximo 15% da parte radicular e 18% de inibição da germinação. Esses dados mostram uma modesta atividade desse composto frente à espécie testada (Salcedo 2007). Em bioensaio de coleóptilo de trigo, esse composto mostrou inibição máxima de 38% a partir da concentração de  $5 \times 10^{-4}$  M, mostrando, segundo o autor, uma atividade pouco relevante para o estudo *Tectona grandis* (Pimienta 2006). Em bioensaio realizado com sementes de alface, a loliolida isolada de folhas de *Equisetum arvense* foi capaz de inibir a germinação dessa espécie (Hiraga *et al.* 1997). Esse composto também foi isolado de outras espécies e sua atividade foi avaliada em bioensaios para girassol (Macías *et al.* 1999a), *Bunia orientalis* (Dietz & Winterhalter 1996), *Vallisneria spiralis* (Xian *et al.* 2006) e *Melilotus messanensis* (Macías *et al.* 1999b). Por outro lado, lactonas sesquiterpênicas isoladas de girassol foram capazes de estimular a germinação de sementes de espécies parasitas de raiz (Luque *et al.* 2000).

Outros exemplos de lactonas sesquiterpênicas com atividade biológica são as guaianolidas. Estas são lactonas sesquiterpênicas citadas como agentes alelopáticos, especialmente na família das Compositae, apresentando uma grande fitotoxicidade (Macías *et al.* 2005). Nesse trabalho, o autor ressalta a importância da estrutura da molécula e a lipofilia, que é o fator chave na absorção de alguns compostos bioativos, como determinantes na biodisponibilidade na célula. A lactona sesquiterpênica guaianolida apresentou uma boa propriedade lipofílica, indicando esses produtos como promissores para a criação de novos herbicidas. Além disso, esse composto também apresenta atividade citotóxica (Yuuya *et al.* 1999), antifúngica (Wedge *et al.* 2000) e larvicida (Neves *et al.* 1999). Em estudo citotóxico guiado por *Helianthus tuberosus*, a

loliolida foi isolada e se mostrou importante no estímulo das defesas metabólicas contra as células cancerígenas (Pan *et al.* 2009). Há relatos também de propriedades repelentes desse composto para insetos (Borkosky *et al.* 1996).

É a primeira vez que a loliolida foi isolada no gênero *Solanum*, mostrando que pode ser um dos compostos responsável pelo potencial herbicida encontrado na espécie estudada, bem como pelas propriedades medicinais e protetoras acima descritas.

## CONCLUSÕES

1. O extrato diclorometânico foi o mais ativo para as espécies de *Solanum* estudadas, com fitotoxicidade mantida mesmo nas concentrações mais baixas;
2. As folhas jovens mostraram maior atividade inibitória do crescimento de coleóptilo na grande maioria das espécies;
3. Dentre as espécies de *Solanum* estudadas, o extrato de diclorometano de folhas jovens e adultas de *S. granuloso-leprosum* se mostrou mais ativo e por isso foi fracionado e purificados seus compostos;
4. Os produtos encontrados nas frações que mostraram fitotoxicidade no crescimento de coleóptilo foram uma lactona sesquiterpênica (loliolida) e um carotenóide (luteína) sendo a ocorrência desses inéditos para *S. granuloso-leprosum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliero, A., Asekun, O., Grierson, D., & Afolayan, A. (2006). Chemical composition of the hexane extract from the leaves of *Solanum pseudocapiscum*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(6): 1054-1056.
- Alves, C. C., Alves, J. M., Silva, T. M., Carvalho, M. G., & Neto, J. J. (2003). Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. *Floresta e Ambiente*, 10(1): 93-97.
- Borkosky, S., Valdés, D., Bardón, A., Díaz, J., & Herz, W. (1996). Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eimocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta*. *Phytochemistry*, 42(6):1637-1639.

- Dietz, H., & Winterhalter, P. (1996). Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. *Phytochemistry*, 42(4):1005-1010.
- Fraga, B. (2005). Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, 22: 465-486.
- Frank, J. (1990). Influence of horsenettle (*Solanum carolinense*) on Snapbean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Science*, 38: 220-223.
- Fukuhara, K., Shimizu, K., & Kubo, I. (2004). Arudonine, and allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. *Phytochemistry*, 65:1283-1286.
- Gancel, A-L.; Alter, P.; Mayer, C.D.; Ruales, J.; Vaillant, F. (2008). Identifying carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. Var. Puyo Hybrid), an Andean fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:11890-11899.
- Güntner, C., Gonzales, A., Reis, R., Gonzalez, G., Vazquez, A., Ferreira, A., Moyna, P. 1997. Effects of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Chemical Ecology*. 23(6): 1651-1659.
- Griffiths, D., Dale, M., Morris, W., & Ramsay, G. (2007). Effects of season and postharvest storage on the carotenoid content of *Solanum phureja* potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 379-385.
- Hiraga, Y., Taino, K., Kurokawa, M., Takagi, R., & Ohkata, K. (1997). (-)-Loliolide and other germination inhibitory active constituents in *Equisetum arvense*. *Natural Product Letters*, 10(6):181-186.
- Hodeges, R., & Porte, A. (1964). The structure of loliolide: a terpene from *Lolium perenne*. *Tetrahedron*, 20(6):1463-1467.
- IAS. (September de 1996). International Allelopathy Society Constitution. *First World Congress on Allelopathy. A Science for the Future* .
- Isoe, S., Katsumura, S., Hyen, B., & Sakan, T. (1971). Biogenetic type synthesis of grasshopper ketone and a possible biogenesis of allenic carotenoids. *Tetrahedron Lett*, 16:1089-1092.

- Luque, A., Galindo, J., Macías, F., & Jorrín, J. (2000). Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobancha cumana* seed germination. *Phytochemistry*, 53:45-50.
- Macías, F.A., Molinillo, J., Torres, A., & Varela, R. C. (1997). Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, 45: 683-683.
- Macías, F.A., Oliva, R., Varela, R., Torres, A., & Molinillo, J. (1999a). Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*, 52: 613-621.
- Macías, F.A., Simonet, A., Galindo, J., & Castellano, D. (1999b). Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry*, 50:35-46.
- Macías, F.A., Galindo, J., Castellano, D., & Velasco, R. (2000). Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48:5288-5296.
- Macías, F.A., Molinillo, J., Galindo, J., Varela, R., Simonet, A., & Castellano, D. (2001). The use of allelopathic studies in the search for natural hericides. *Journal of Crop Production*, 4: 237-255.
- Macías, F.A., Velasco, R., Castellano, D., & Galindo, J. (2005). Application of Hansch's model to guaianolide ester derivatives: a quantitative structure-activity relationship study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53:3530-3539.
- Macías, F.A., Bastidas-Oliveros, A., Marín, D., Carrera, C., Chinchilla, N., & Molinillo, J. (2008). Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochem. Review*, 7:179-194.
- Mallik, A. (2000). Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 2007-2009.
- Maraschin-Silva, F., & Aqüila, M. E. (2006). Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 20(1):61-69.
- Marchi, G., Marchi, E., Wang, G., & Mcgiffen, M. (2008). Effect of age of a sorgum-sudangrass hybrid on its allelopathic action. *Planta Daninha*, 26(4):707-716.

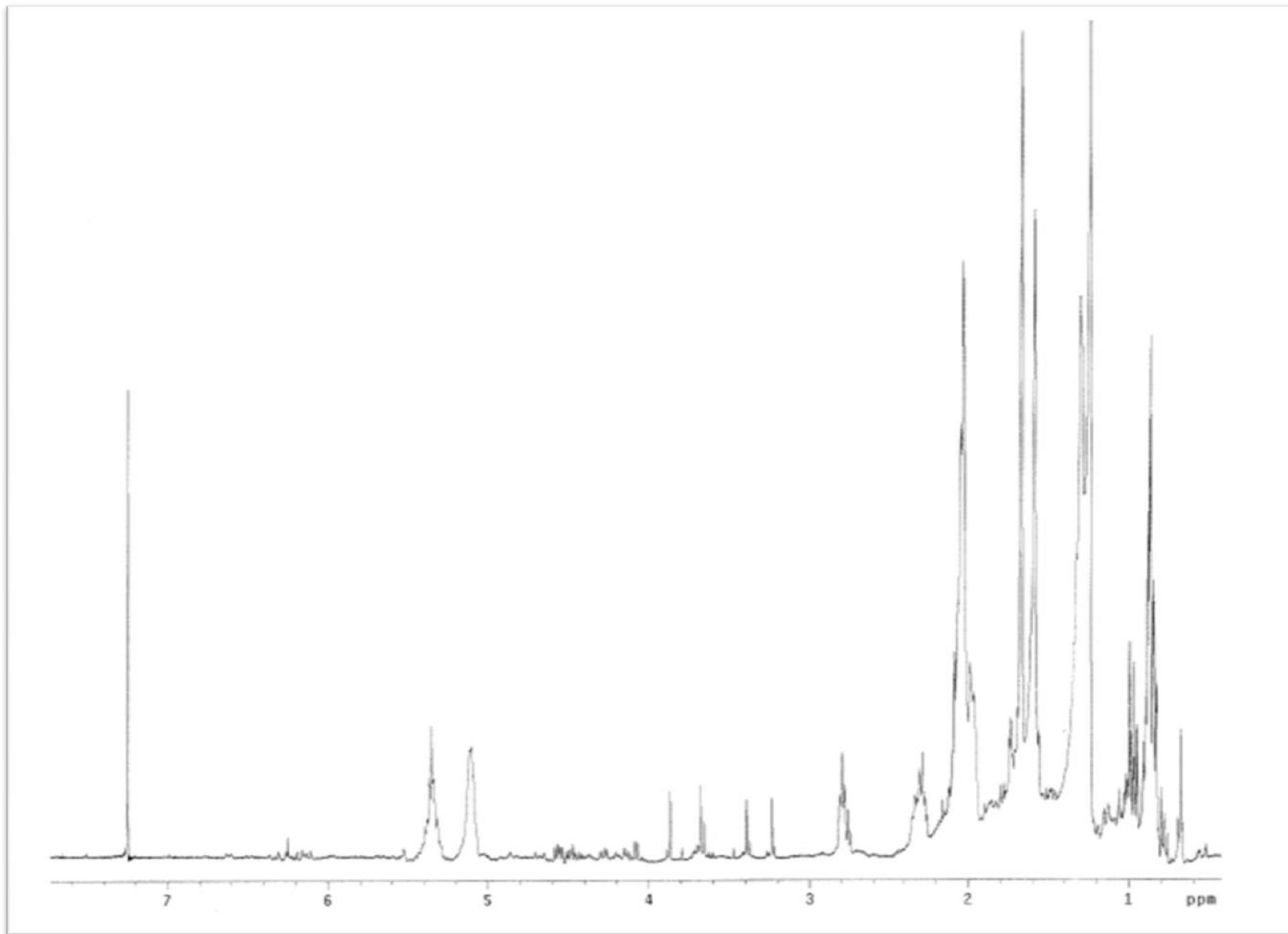
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F., Franssen, M., Beale, M., & Bouwmeester, H. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*, 139(2):920-934.
- Molnár, P., Deli, J., Osz, E., Zsila, F., Simonyi, M., & Tóth, G. (2004). Confirmation of the absolute (3R, 3'S,6'R)-configuration of (all-E)-3'-Epilutein. *Helvetica Chimica Acta*, 87: 2159-2167.
- Morais, A. (2007). *Diversidade de carotenóides antioxidantes em frutos de espécies de Solanum (seção Lycopersicon): caracterização via cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) e análise filogenética do gene codificador da enzima licopeno-β-ciclase*. Univerisidade de Brasília, Insituto de biologia, Departamento de Biologia Celular: Tese de doutorado 131p.
- Neves, M., Morais, R., Garner, S., Stoeckí-Evans, H., & Hostett-mann, K. (1999). New sesquiterpene lactones from the portuguese liverwort *Targionia lorbeeriana*. *Phytochemistry*, 50: 967-972.
- Oliveira, S. C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004). Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta bot. bras.* , 18 (3):401-406.
- Pan, L., Sinden, M., Kennedy, A., Chai, H., Watson, L., Graham, T., et al. (2009). Bioactive constituents of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke). *Phytochemistry Letters*, 2:15-18.
- Pimienta, R. R. (2006). *Estudios alelopáticos de espécies forestales cubanas. Tectona grandis*. Cádiz, Espanha: Tese de doutorado.
- Raju, M., Varakumar, S., Lakshminarayana, R., Krishnakantha, T., & Baskaran, V. (2007). Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry* , 101, pp. 1598-1605.

- Reinhardt, C., Van der Laan, R., Belz, R., Hurle, K., & Foxcroft, L. (2006). Production dynamics of the allelochemical parthenin in leaves of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Plant Diseases and Protection*, XX, pp. 427-433.
- Rice, E. (1974). *Allelopathy*. New York: Academic Press.
- Salcedo, N. C. (2007). *Estudios Alelopáticos de Oryza sativa L.* Cádiz, Espanha: Tese de doutorado.
- Silva, S. (1996). *Gênero Solanum (Solanaceae) no Distrito Federal, Brasil.* Universidade de Brasília: Departamento de Botânica. Dissertação de mestrado.
- Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Braz-filho, R. 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova*. 26(4): 517-522.
- Smith, B.S., Pawlak, J.A., Murray, D.S., Verhalen, L.M., Green, J.D. 1990. Interference from established stands of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) on cotton (*Gossypium hirsutum*) Lint Yield. *Weed Science*. 38: 129-133.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. Artmed.
- Tajuddin, Z., Shaukat, S.S., Siddiqui, I.A. 2002. Allelopathic potential of *Solanum forskalii* Dunal: A tropical ruderal weed. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(8): 866-868.
- Wandscheer, A., & Pastorini, L. (2008). Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. *Ciência Rural*, 38(4);949-953.
- Wardle, D., Nicholson, K., & Ahmed, M. (1992). Comparison of osmotic and allelopathic effects of grass leaf extracts on grass seed germination and radicle elongation. *Plant and Soil*, 140:315-319.
- Webster, S. (1980). *New Collegiate dictionary*. Merriam, C.Co. Springfield.
- Wedge, D., Galindo, J., & Macías, F. (2000). Fungal activity of several natural and synthetic sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 53:747-757.

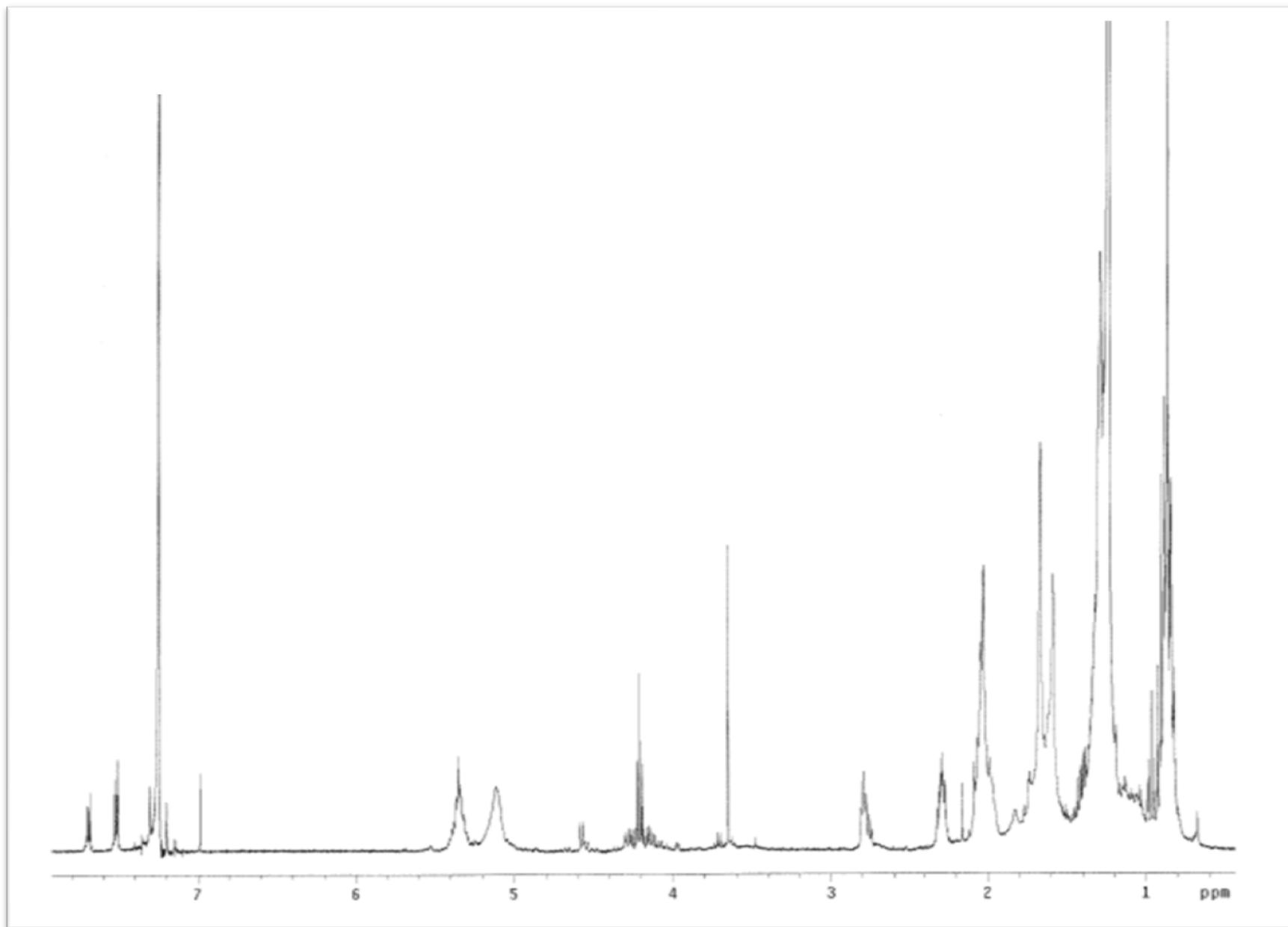
- Xian, Q., Chen, H., Liu, H., Zou, H., & Yin, D. (2006). Isolation and identification of antifungal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation. *Environmental Science Pollution Research*, 13(4):233-237.
- Ye, W.-C., Wang, H., Zhao, S.-X., & Che, C.-T. (2001). Steroidal glycoside and glycoalkaloid from *Solanum lyratum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29:421-423.
- Yuuya, S., Hagiwara, H., Suzuki, T., Ando, M., Yamada, A., Suda, K., et al. (1999). Guaianolides as immuno-modulators; Synthesis and biological activities of dehydro-costuslactone, mokko lactone, eremathin, and their derivatives. *Journal of Natural Products*, 62:22-30.
- Zhou, S., He, S., Wang, G., Gao, H., Zhou, G., Ye, W., et al. (2006). Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. *Journal of Natural Products*, 69:158-1163.

## ANEXO I

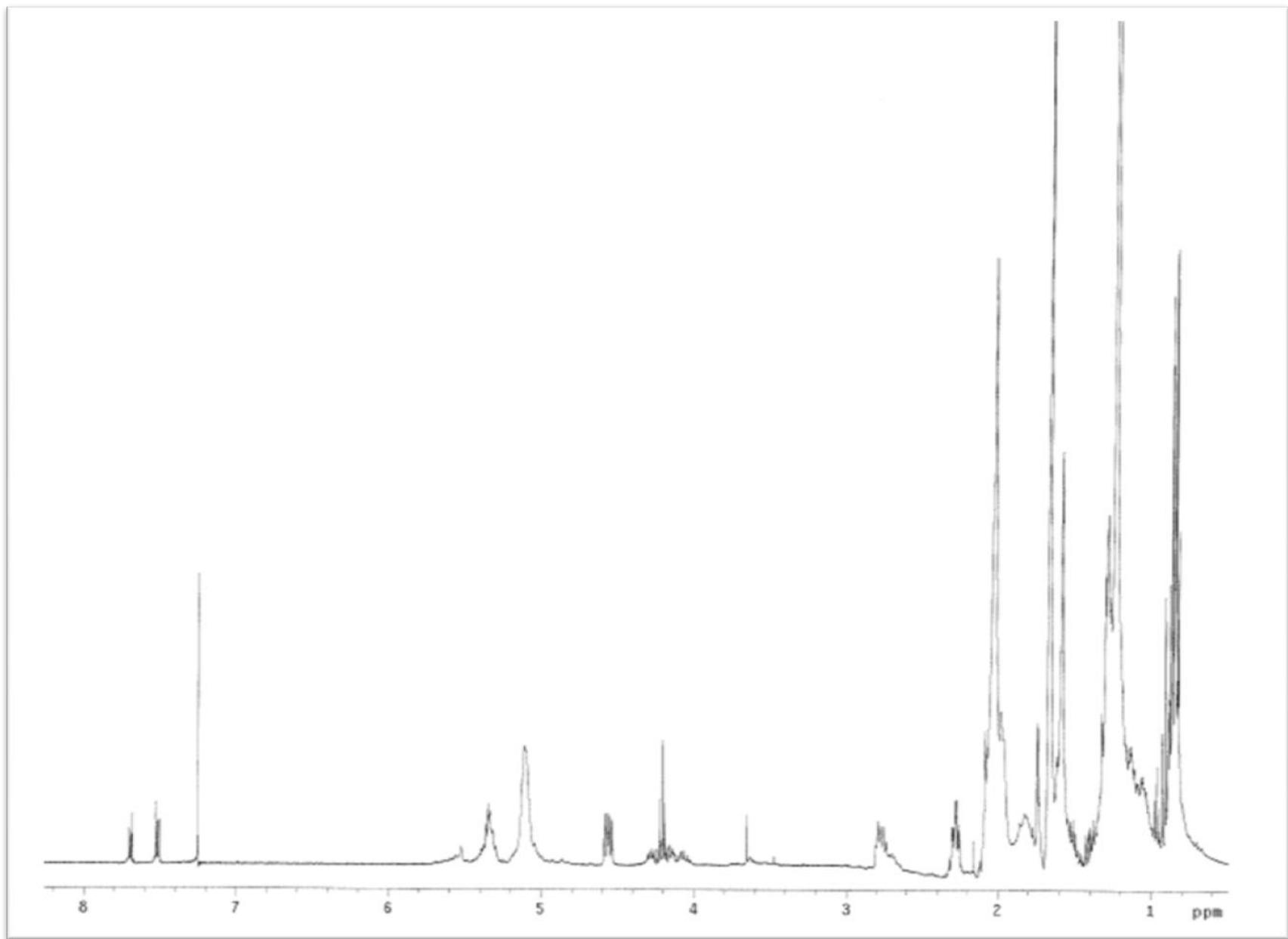
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos extratos diclorometânico  
das espécies de *Solanum* estudadas



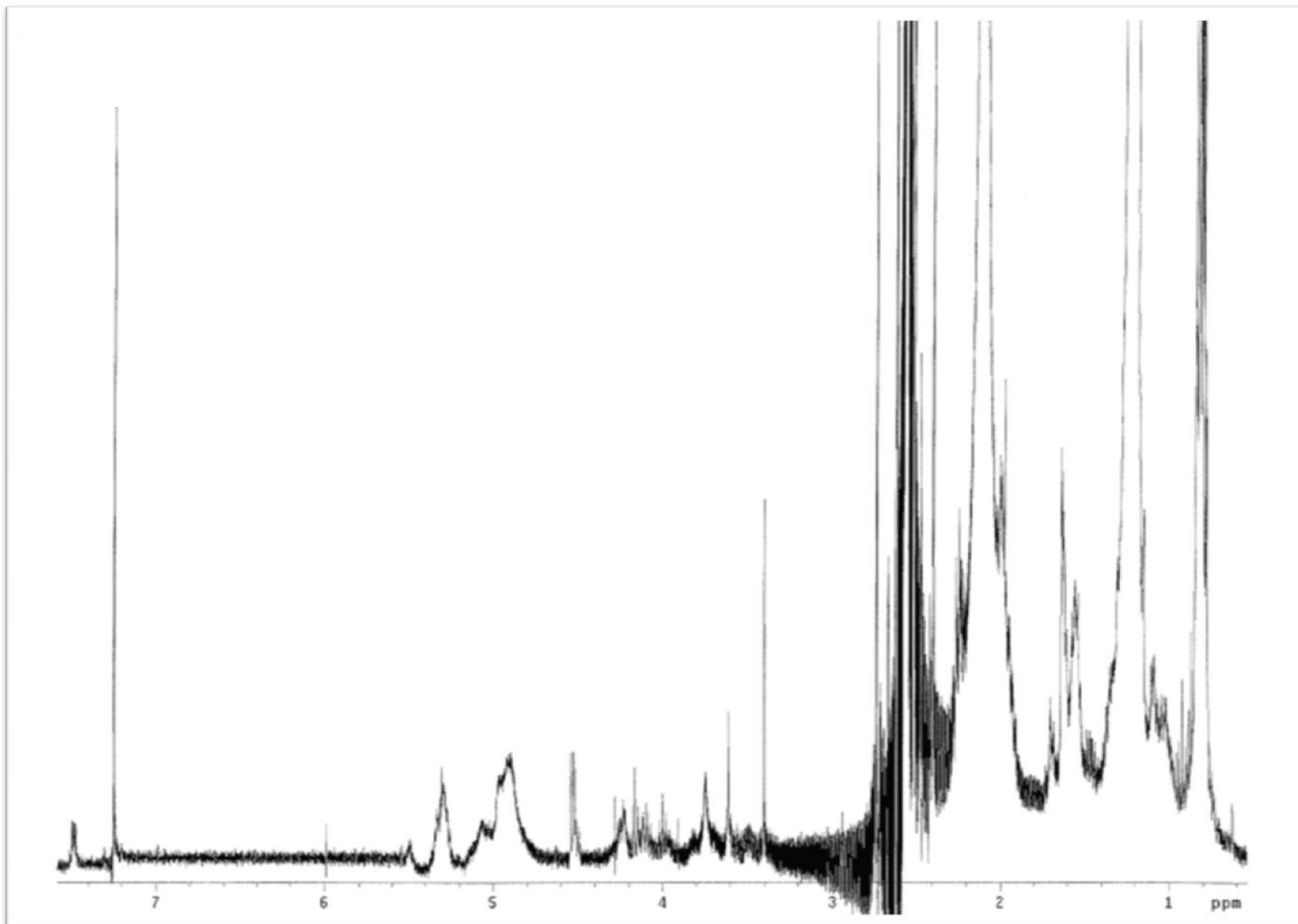
RMN- $^1\text{H}$  do extrato de diclorometano de folhas adultas de *S. granuloso-leprosum*.



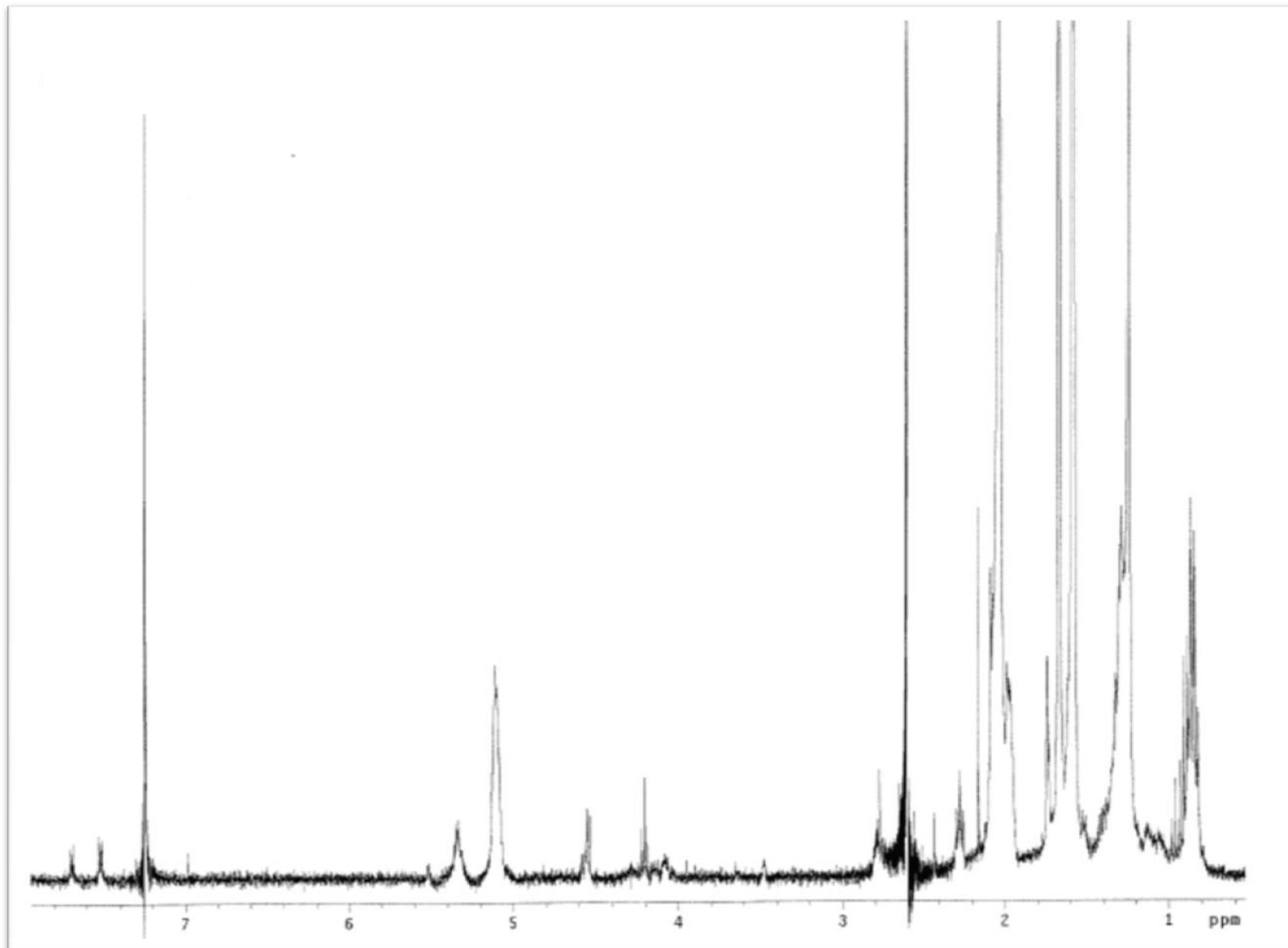
RMN-<sup>1</sup>H do extrato de diclorometano de folhas jovens de *S. granuloso-leprosum*.



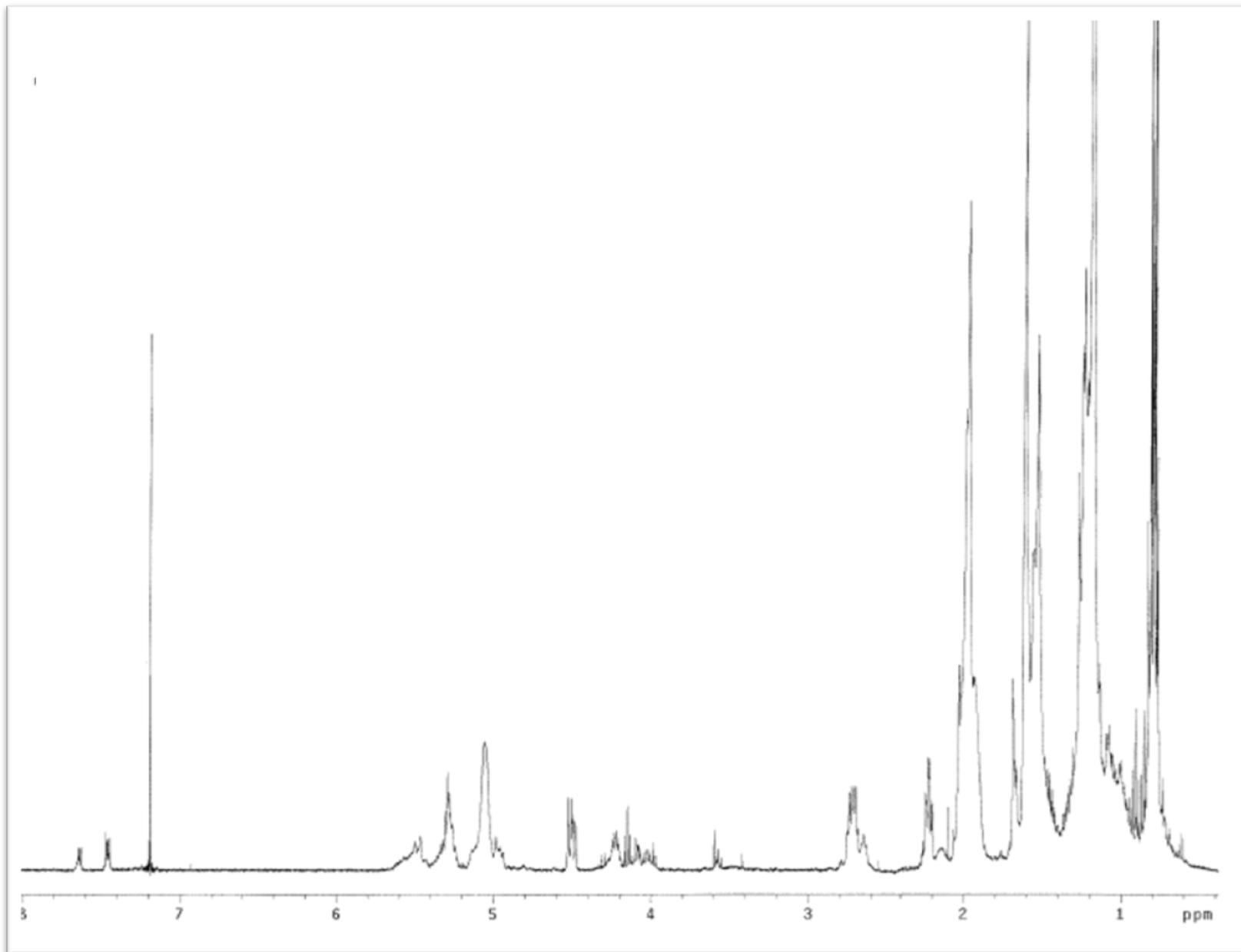
RMN- $^1\text{H}$  do extrato diclorometano das folhas adultas de *S. subumbellatum*.



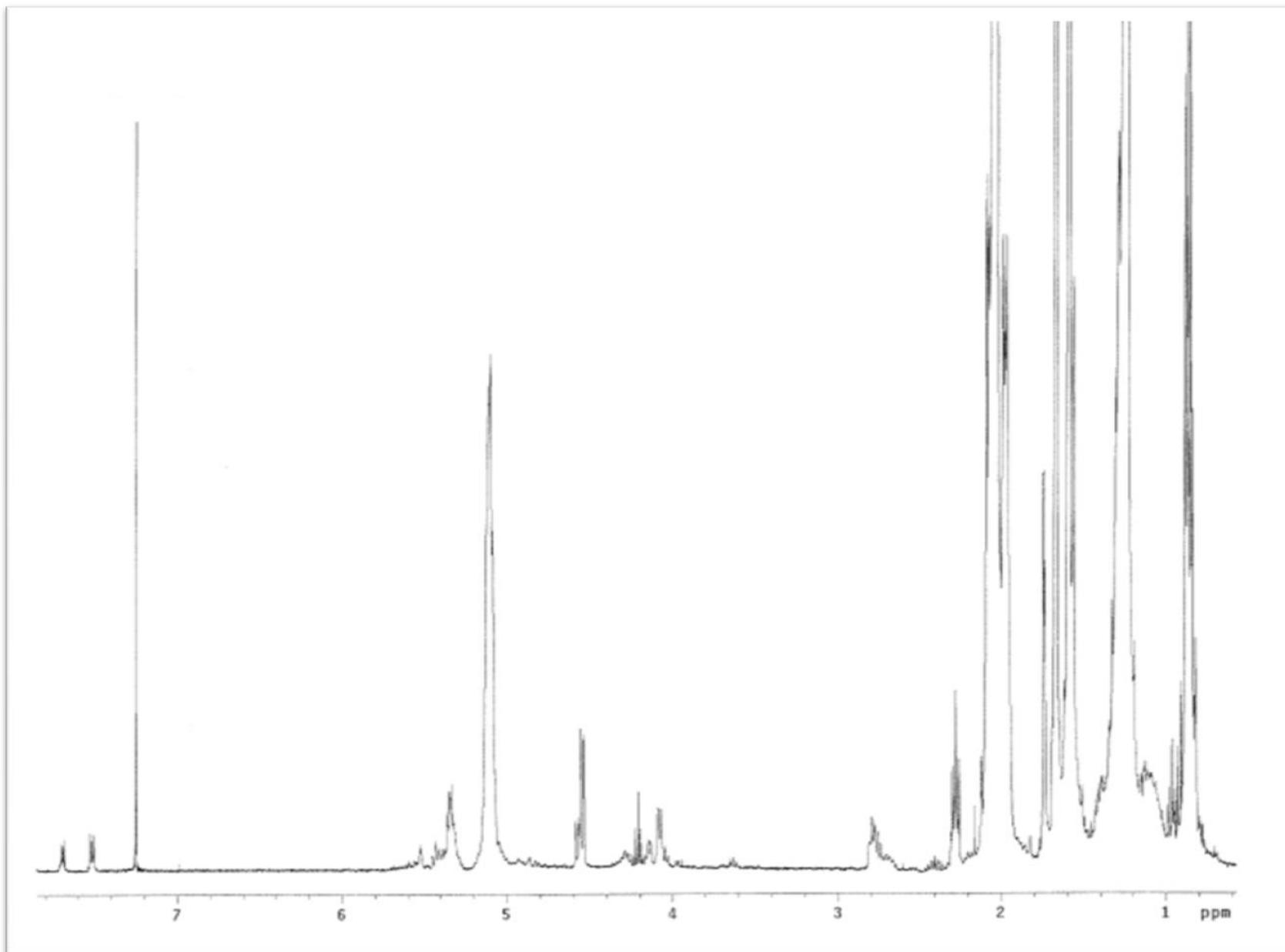
RMN- $^1\text{H}$  do extrato diclorometano das folhas jovens de *S. subumbellatum*.



RMN- $^1\text{H}$  do extrato diclorometano das folhas adultas de *S. paniculatum*.



RMN-<sup>1</sup>H do extrato diclorometano das folhas jovens de *S. paniculatum*.

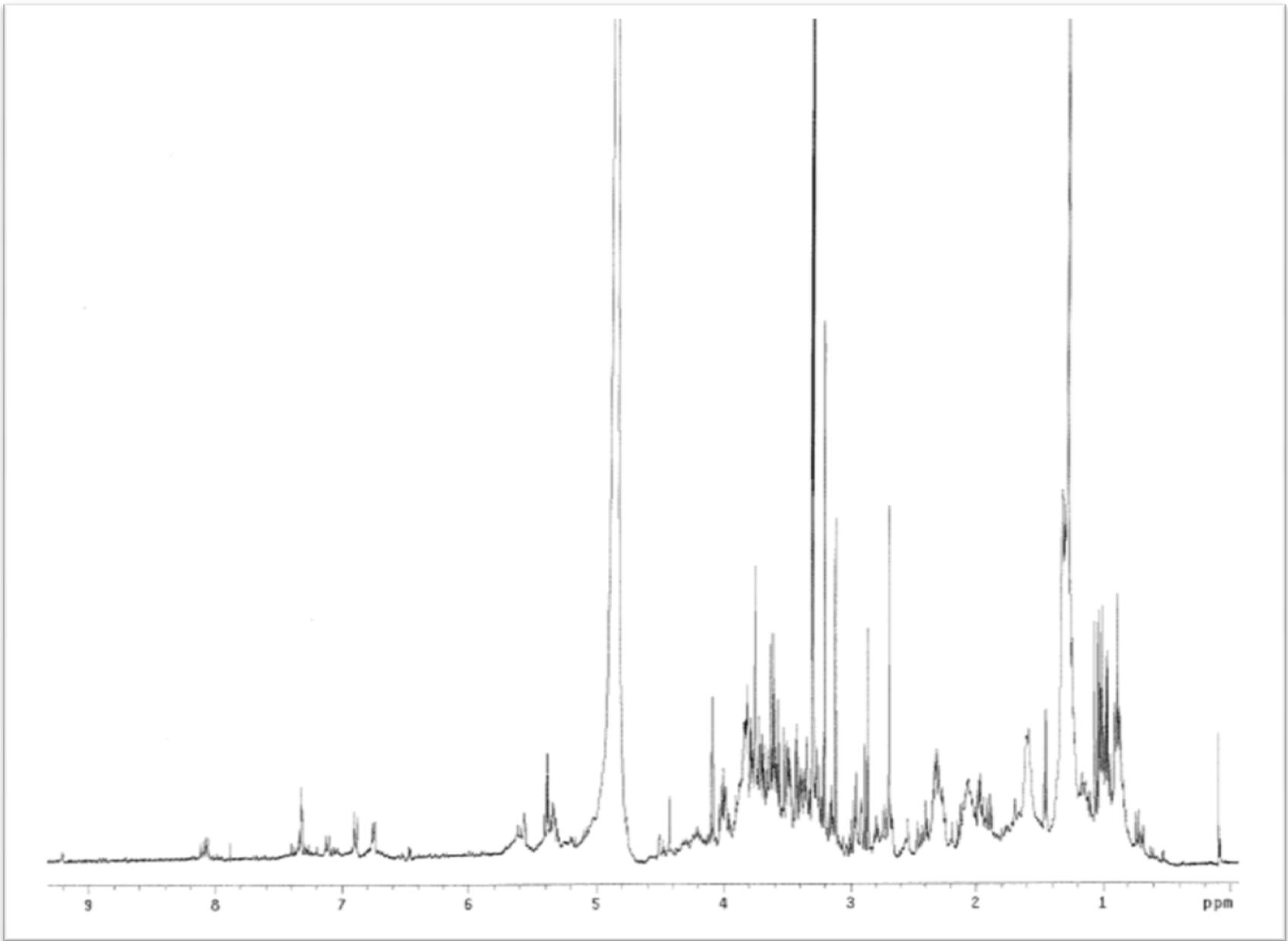


RMN- $^1\text{H}$  do extrato diclorometano das folhas adultas de *S. lycocarpum*.

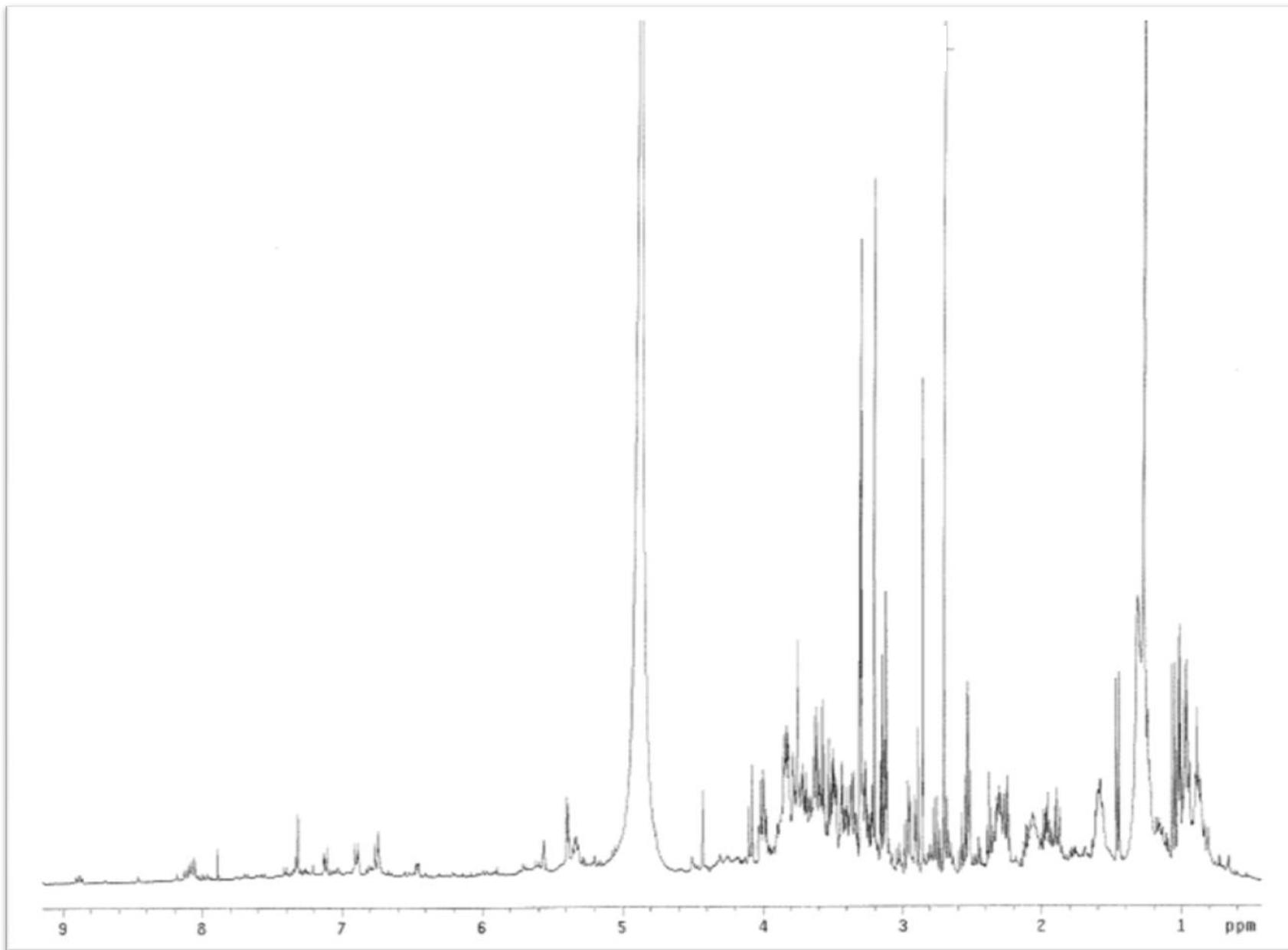
## ANEXO II

Espectros de RMN-<sup>1</sup>H dos extratos metanólico  
das espécies de *Solanum* estudadas

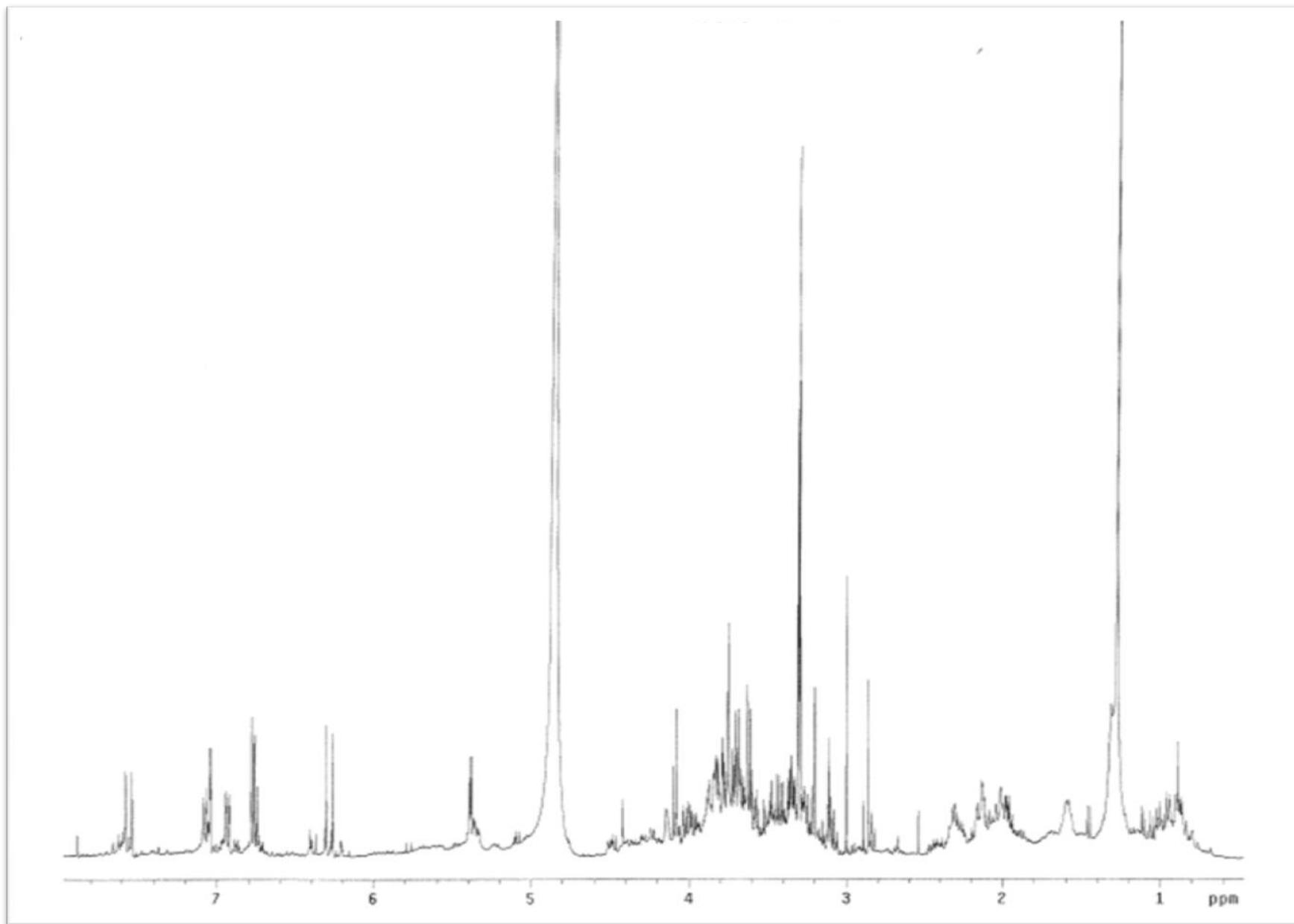




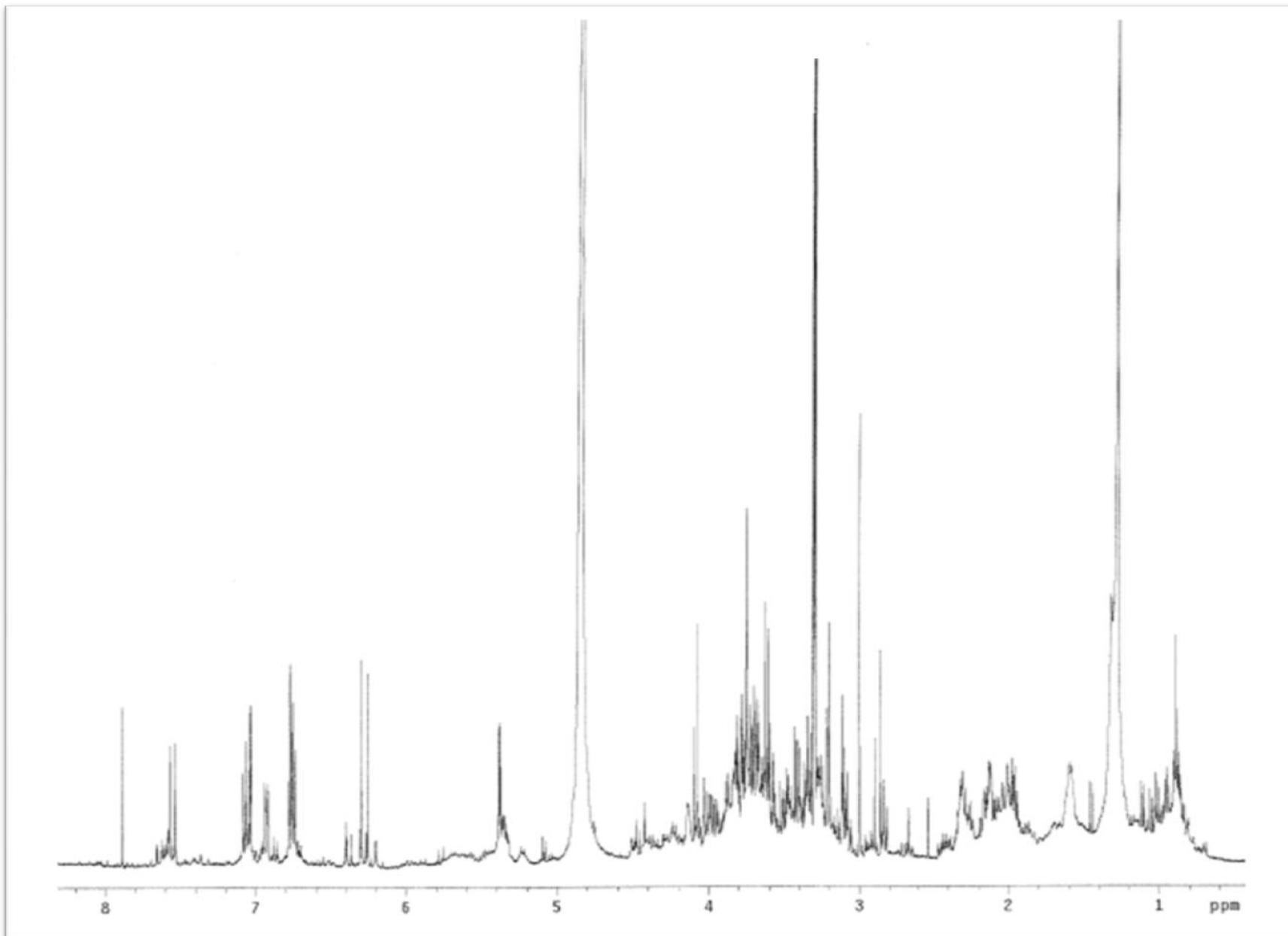
RMN- $^1\text{H}$  do extrato de metanol das folhas adultas de *S. granuloso-leprosum*.



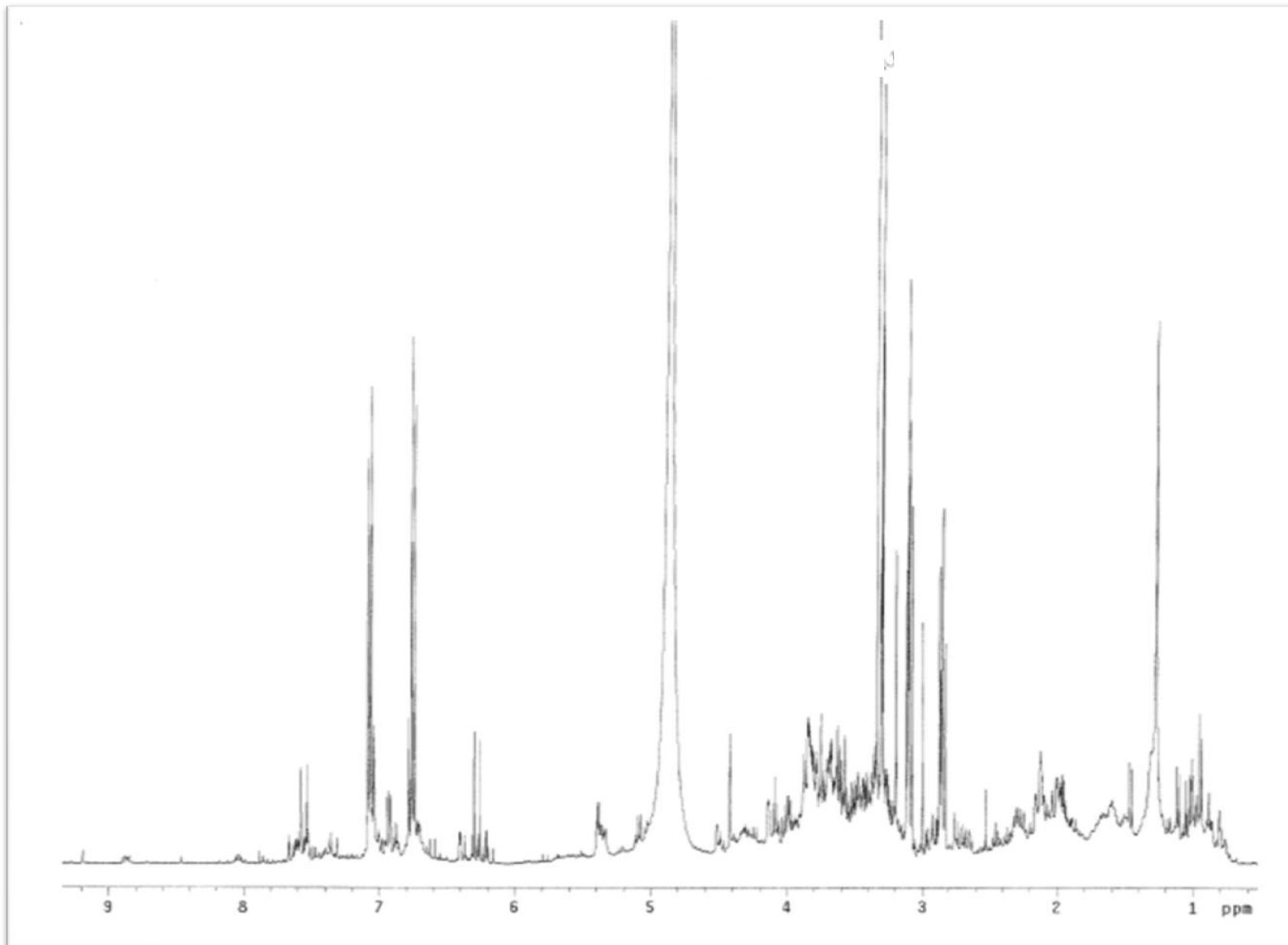
RMN-<sup>1</sup>H do extrato de metanol das folhas jovens de *S. granuloso-leprosum*.



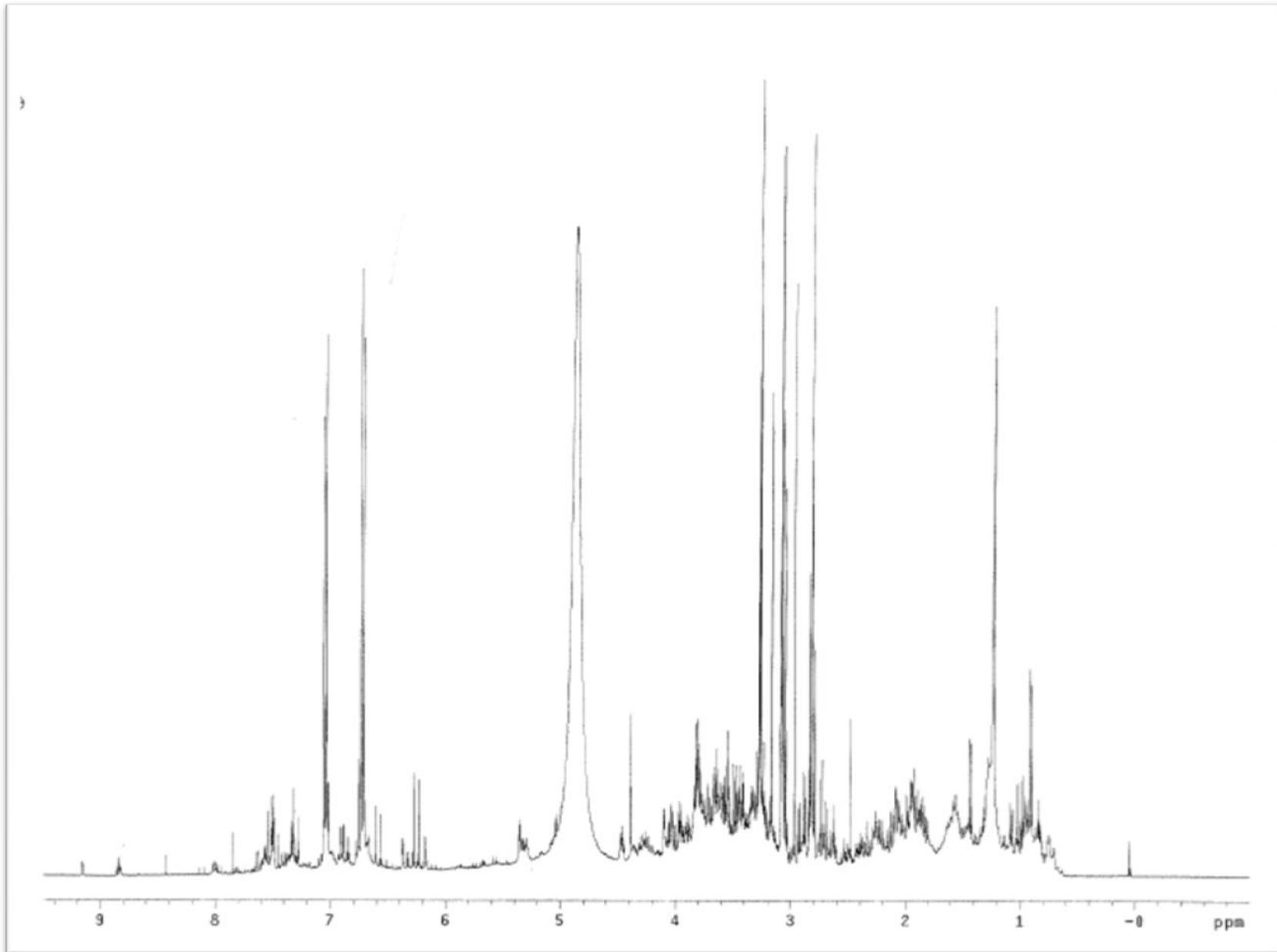
RMN- $^1\text{H}$  do extrato de metanol das folhas adultas de *S. subumbellatum*.



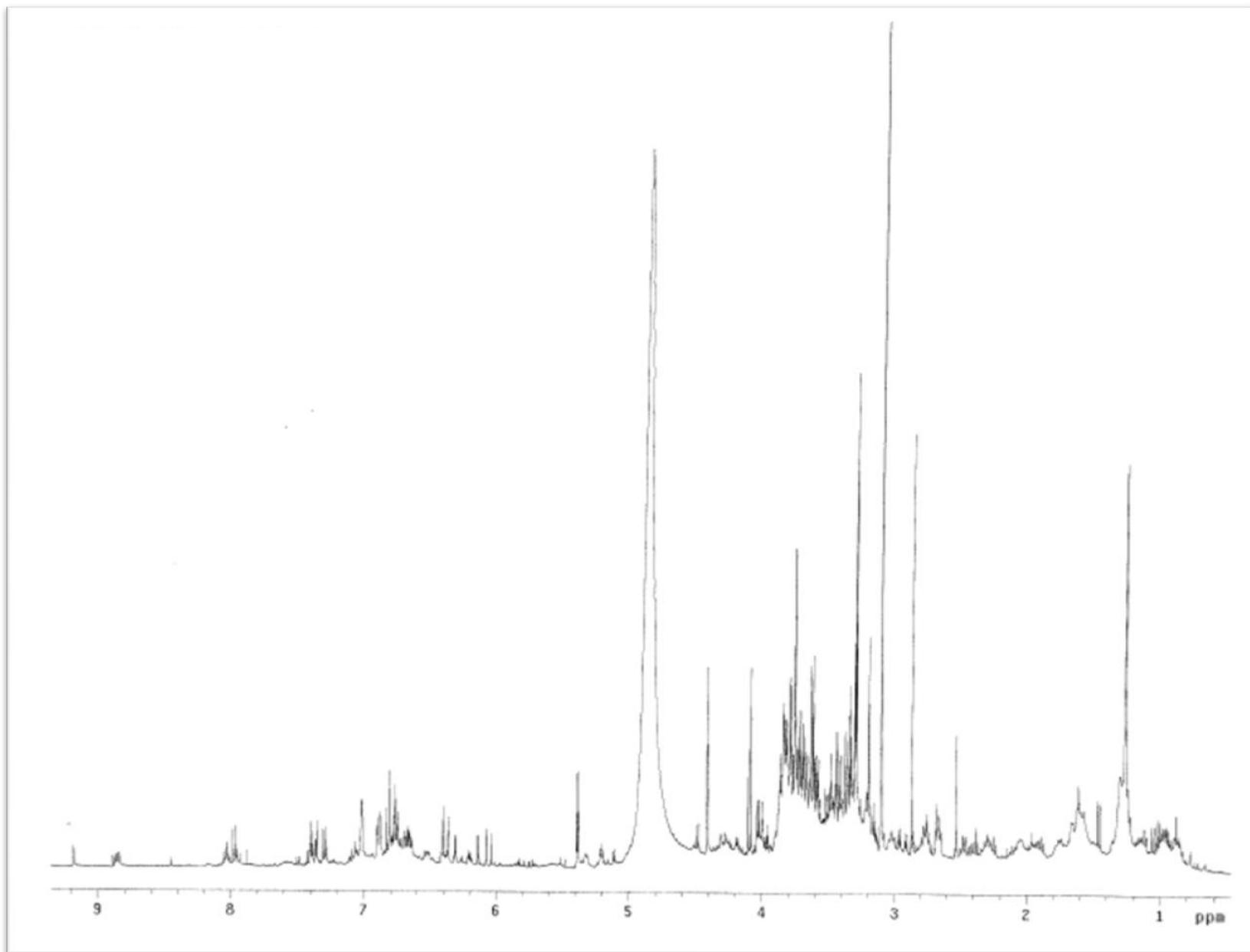
RMN-<sup>1</sup>H do extrato de metanol das folhas jovens de *S. subumbellatum*.



RMN- $^1\text{H}$  do extrato de metanol das folhas adultas de *S. paniculatum*.



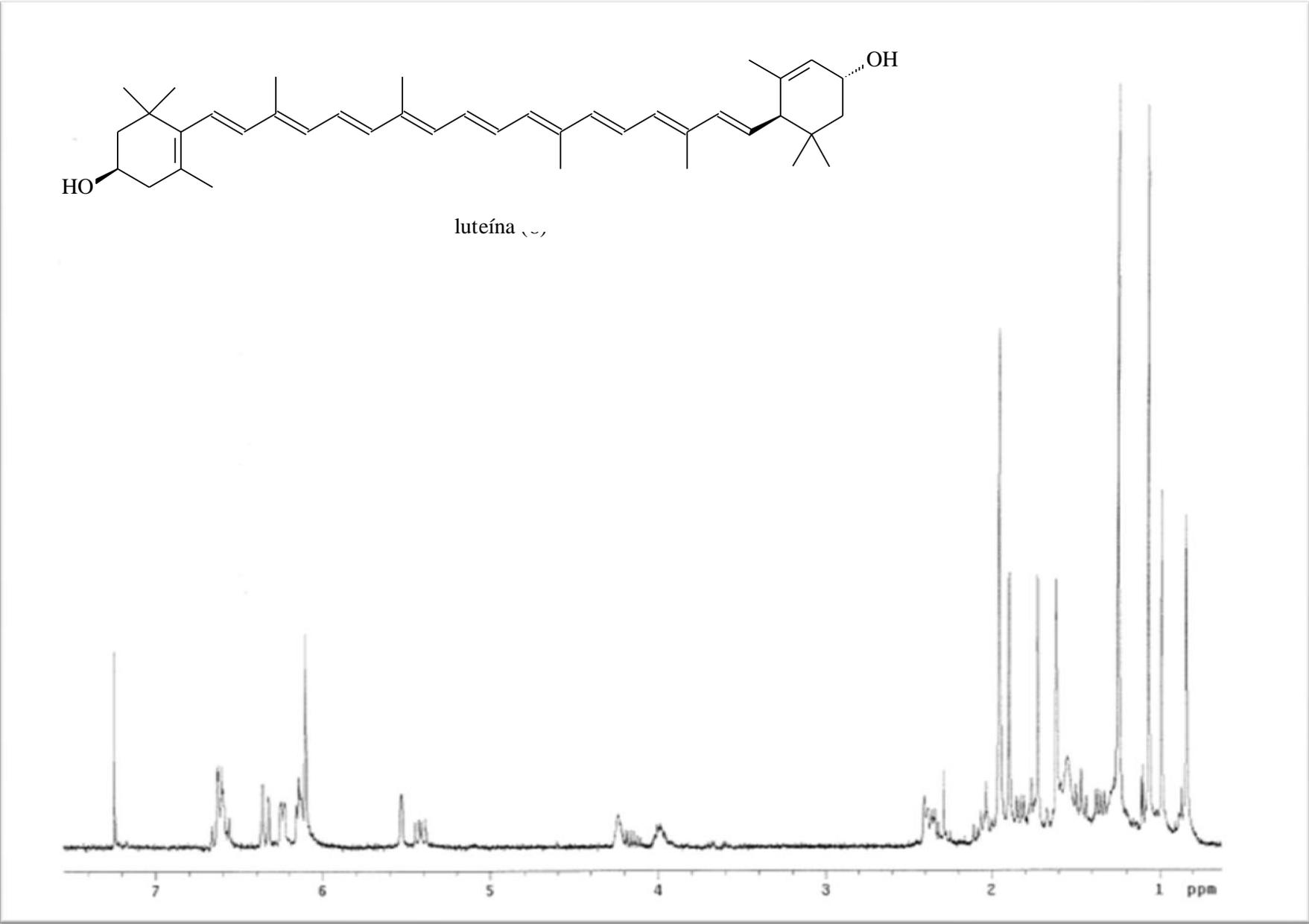
RMN- $^1\text{H}$  do extrato de metanol das folhas jovens de *S. paniculatum*.



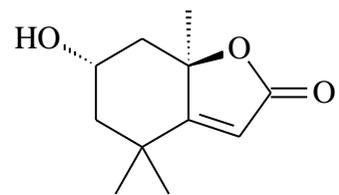
RMN- $^1\text{H}$  do extrato de metanol das folhas adultas de *S. lycocarpum*.

## ANEXO III

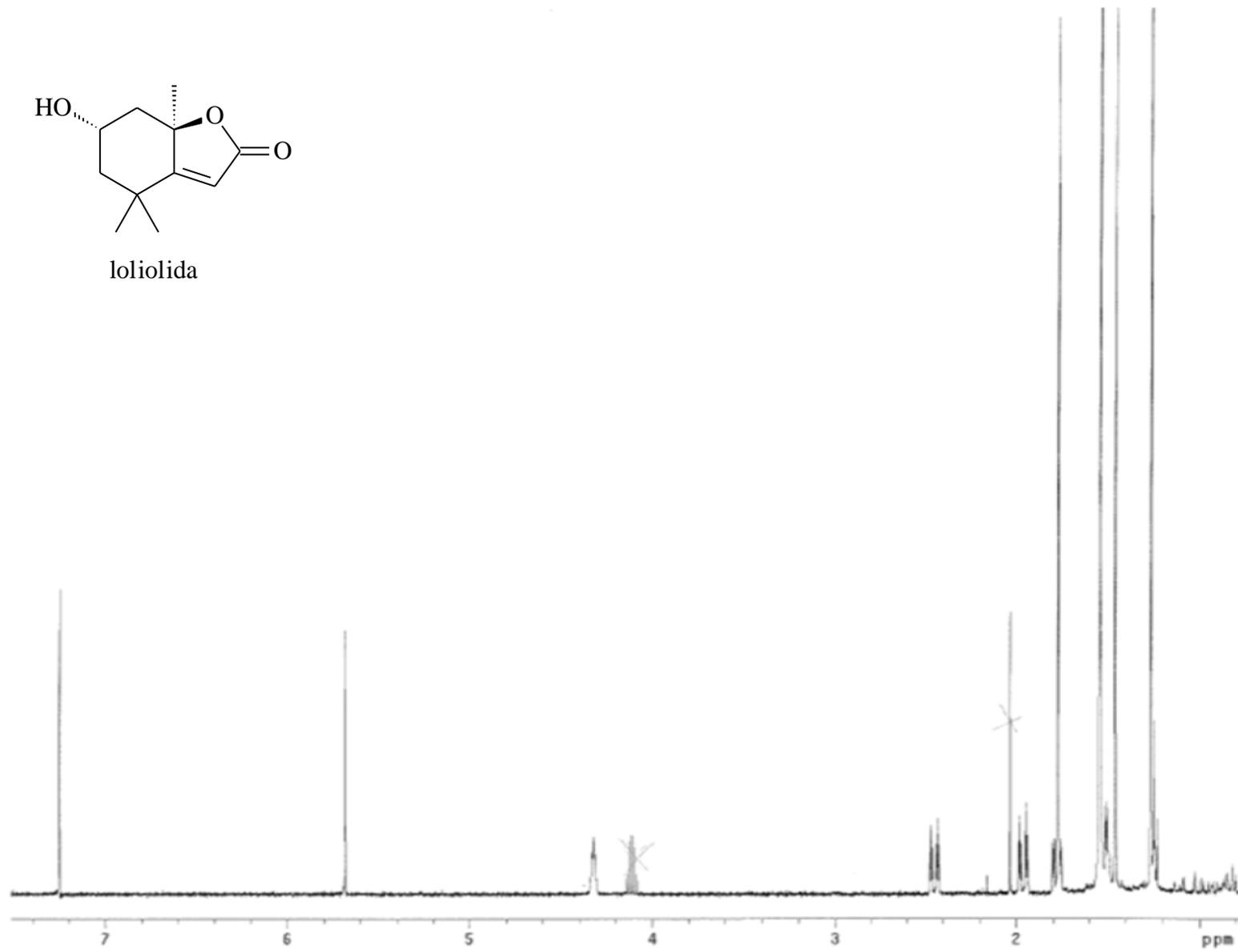
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H dos compostos do extrato diclorometânico das folhas de *Solanum granuloso-leprosum*.



MN-<sup>1</sup>H do carotenóide luteína



loliolida



RMN-<sup>1</sup>H da loliolida

# Capítulo 3

**Estudo fitotóxico de extratos de folhas  
de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.**

ESTUDO FITOTÓXICO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *SOLANUM LYCOCARPUM* A. ST.-HIL.

**RESUMO:** *S. lycocarpum* é conhecida popularmente como “lobeira ou fruta-do-lobo” e é uma espécie muito comum em ambientes alterados do Cerrado. O efeito alelopático de suas folhas e frutos é conhecido em condições de laboratório. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito fitotóxico de diferentes extratos de folhas jovens de lobeira em bioensaios de semente e coleótilo de trigo bom como identificar os produtos presentes nos extratos ativos. As folhas de lobeira foram extraídas com solventes orgânicos em polaridade crescente e em fracionamento líquido-líquido e os extratos testados sua atividade em quatro espécies (tomate, alface, cebola e agrião) além de crescimento de coleótilo estiolado de trigo. O extrato de diclorometano e acetona foram então fracionados em coluna cromatográfica e purificados em CLAE. Foram isolados e identificados 6 compostos sendo estes: estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina, oleato glicerol, ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico. A atividade alelopática desses produtos foram discutidas conforme dados da literatura e ainda não haviam sido descritos a presença desses produtos em folha de lobeira.

**Palavras-chave:** Cerrado, lobeira, fitotóxico, bioensaio, fitoquímica.

**ABSTRACT:** *S. lycocarpum* is popularly known as “lobeira or fruit-of-wolf” and is a very common species in disturbed habitats of the Cerrado. The allelopathic effect of leaves and fruits is known in laboratory conditions. The aim of this study was to evaluate the phytotoxic effect of different extracts of young leaves lobeira bioassays seed and coleoptiles of wheat to identify the products present in active extracts. Lobeira leaves were extracted with solvents in increasing polarity and fractionation liquid-liquid and tested its activity in four species (tomato, lettuce, onion and watercress) as well as growth of etiolated wheat coleoptile. The extract of acetone and dichloromethane were then fractionated on column chromatography and purified by HPLC. Were isolated and identified and these 6 compounds: stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amyrin, glycerol oleate, octadecanoic acid and hexadecanoic acid. The allelopathic activity of these products were discussed as literature data and had not yet been described the presence of these products in leaves lobeira.

**Key words:** cerrado, lobeira, phytotoxic, bioassay, phytochemistry.

## INTRODUÇÃO

Alelopatia envolve a interação química de plantas e microrganismos tanto em ambientes naturais quanto em sistemas agrícolas. Essa interação se dá devido à liberação no ambiente de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas e microrganismos que podem produzir efeitos positivos ou negativos (Rice 1984; IAS 1996). As formas de liberação dos compostos no ambiente pela planta produtora até atingir a planta receptora pode ser pelos seguintes modos: volatilização, lixiviação, decomposição e exudação das raízes (Ferreira & Àquila 2000). Existe uma ampla variedade de agentes alelopáticos que são sintetizados e armazenados em diferentes células das plantas, seja na forma livre ou conjugada com outras moléculas, e que são liberadas no ambiente como uma resposta a fatores de estresse biótico e abiótico (Inderjit & Nielsen 2003).

A descoberta de novos aleloquímicos (produtos naturais com atividade biológica) é uma alternativa ao uso de herbicidas convencionais no controle de plantas invasoras. Os herbicidas atuais têm provocado mudanças nas populações de espécies invasoras além do risco de contaminação ambiental e o aumento da resistência a esses compostos (Olofsdotter & Madsen 2000; Duke *et al.* 2000).

Os estudos com os novos aleloquímicos podem levar à produção de outro tipo de herbicida, quer para uso direto dos compostos descobertos quer como modelos moleculares para síntese de novos agroquímicos (Dias & Dias 2007). Um caso bem descrito é a cinmetilina, um herbicida análogo aos monoterpenos naturais 1,4- e 1,8-cineol (eucaliptol), que apresenta um modo de ação distinto dos herbicidas convencionais, sendo uma alternativa para plantas invasoras que já desenvolveram algum tipo de resistência (Romagni *et al.* 2000). Na busca de novos aleloquímicos, alguns métodos podem ser usados para pesquisar os novos compostos fitotóxicos, tais como o isolamento biodirigido. Este método consiste em realizar bioensaios em cada uma das etapas de isolamento, determinando a (s) fração (ões) testada (s) que apresenta (m) maior atividade biológica. A fração mais ativa é fracionada novamente até a purificação e identificação dos compostos aí presentes, responsáveis pela atividade detectada (Macías *et al.* 2000a). Em alguns casos, a atividade pode ser perdida durante o fracionamento por modificações químicas ou degradação, e outro evento, não menos

importante, é o papel do sinergismo de frações e produtos ativos que se está estudando (Dayan & Duke 2006). Assim, o isolamento biodirigido é uma ferramenta importante no estudo alelopática como uma forma de monitorar todos esses fatores.

Em ambientes naturais, a alelopátia desempenha um importante papel na dominância, sucessão e formação de comunidades vegetais (Chou 1999), além de ser uma das estratégias importantes de colonização de muitas plantas exóticas sobre a comunidade natural (Hierro & Callaway 2003).

O gênero *Solanum* apresenta várias espécies com potencial para estudos de alelopátia. Estas espécies apresentam uma grande diversidade de compostos químicos, como os glicoalcalóides e glicosideoesteróides, de atividade alelopática comprovada (Ye *et al.* 2001; Alves *et al.* 2003; Fukuhara *et al.* 2004), flavonas e flavonóides (Silva *et al.* 2003), além de vários hidrocarbonetos, terpenos e ácidos graxos (Aliero *et al.* 2006) e saponinas esteroidais (Zhou *et al.* 2006a). *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) é conhecido popularmente como lobeira ou fruta do lobo e ocorre em alta frequência em ambientes perturbados do bioma Cerrado (Lombardi & Motta Jr. 1993). A atividade alelopática de extratos brutos de folha e fruto já foi estudada em diferentes substratos, como papel (Oliveira *et al.* 2004a; Oliveira *et al.* 2004b) e solo (Aires *et al.* 2005). A composição fitoquímica do fruto é bem conhecida por apresentar propriedades farmacêuticas importantes (Dall'Agnol & Poser 2000; Schwarz *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2008), mas não há trabalhos nessa área com folhas e nem com enfoque alelopático.

Devido as evidências da atividade alelopática da lobeira, o presente trabalho teve por objetivo analisar a atividade fitotóxica de extratos orgânicos e aquosos de folhas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil e isolar e identificar os compostos ativos presentes.

## MATERIAL E METODOS

### COLETA DAS FOLHAS DE *Solanum lycocarpum*

As folhas jovens (acima do segundo nó a partir do ápice) de *S. lycocarpum* foram coletadas no mês de novembro de 2007, na Fazenda Sucupira/EMBRAPA em Brasília-DF, nas coordenadas S15°55'41,8'' W 048°01'47,3' Brasília - Brasil. Durante a coleta, as folhas foram colocadas em sacos de papel e consideradas como folhas jovens aquelas coletadas acima do segundo nó de cada ramo. Estas foram secas em estufa de circulação forçada até peso constante a 50 °C e, em seguida, trituradas com auxílio de um liquidificador, produzindo um pó que foi embalado a vácuo até seu processamento, no Laboratório de Alelopatía na Universidade de Cádiz, Espanha, com licença do IBAMA N° 07BR001206/DF.

### EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DAS FOLHAS JOVENS DE LOBEIRA

Para a identificação das substâncias químicas com atividade alelopática, presentes nas folhas de lobeira, foram realizados dois tipos de extração: uma que constituiu na obtenção de extratos a partir do pó das folhas utilizando solventes orgânicos diretamente com polaridade crescente e outra onde primeiramente, foi preparado um extrato aquoso do pó das folhas seguido de fracionamento líquido-líquido.

### EXTRAÇÃO DIRETA COM SOLVENTES ORGÂNICOS

O pó das folhas jovens de lobeira apresentou melhor atividade nos bioensaios realizados no capítulo 1 e, por isso, foi eleito para identificação dos seus compostos. Nesta extração, utilizou-se um total de 120 g de pó de folha. A extração foi realizada em potes de vidro com tampa onde cada 30 g de pó eram extraídos com 300 mL de solvente orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol) na proporção de 1:10. Estes foram mantidos em banho de ultrassom por um período de 1 hora. O ultrassom foi escolhido como método de extração devido a duas razões previamente testadas: o menor tempo de exposição do material vegetal ao solvente e o maior rendimento, chegando ao dobro do método de extração comum de 24 h sob agitação. Trabalhos como os de Albu *et al.* (2004) e Rostagno *et al.* (2003)

usaram com sucesso o ultrassom na extração de compostos secundários, com a melhoria do rendimento. Depois do período de uma hora, o extrato foi filtrado em funil de Büchner, com papel de poro 0,22  $\mu\text{m}$ , acoplado a uma bomba a vácuo e depois evaporado em rotavapor. Essa extração se repetiu duas vezes para cada solvente orgânico. Os solventes orgânicos utilizados foram: Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH).

## EXTRAÇÃO AQUOSA

Para a preparação do extrato aquoso foram utilizados 348 g do pó da folha que foi extraído inicialmente em água destilada na proporção 1:10 em ultrassom, durante 1 hora. Em seguida, filtrado a vácuo, com filtro de papel de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, e evaporado em rotavapor. O extrato obtido foi pesado ( $m = 42,09$  g) e novamente dissolvido em 200 mL de água e colocado em um funil de separação de 1000 mL. Em seguida foram adicionados 200 mL de diclorometano que foi levemente agitado para evitar a formação de emulsões durante esse processo. A mistura foi deixada em um suporte para separação das fases e o solvente orgânico retirado. No fracionamento com diclorometano, essa operação foi repetida 8 vezes. Em seguida, foi adicionado acetato de etila e repetido o mesmo procedimento descrito para diclorometano, a diferença foi o número de repetições do processo que foram 5. O critério usado para escolha do número de repetições do processo de fracionamento se deu até que o líquido saísse límpido. Um resumo da rota de extração utilizado pode ser visualizado na Figura 1.3.

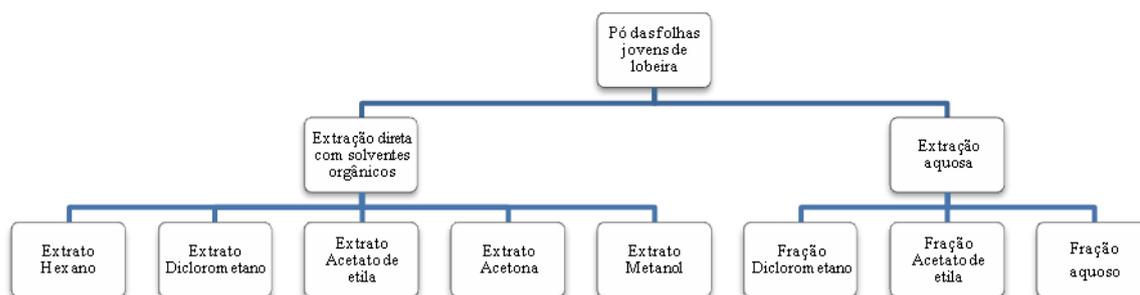


Figura 1.3. Fluxograma com as extrações e fracionamentos realizados com o pó da folha de *S. lycocarpum*.

## BIOENSAIOS

Os bioensaios utilizados para verificar o efeito fitotóxico dos extratos de folha de lobeira foram de crescimento de coleóptilo estiolado de trigo estiolado e de sementes de espécies alvos padrão, conhecidas com o STS (*Standard Target Species*) que são essas agrião, alface, cebola e tomate.

### BIOENSAIO DE COLEOPTILO DE TRIGO

O bioensaio de coleóptilo de trigo foi proposto por Cutler (1985). Esses ensaios eram utilizados fundamentalmente para a avaliação da atividade de metabólitos de origem microbiana como reguladores de crescimento de planta. São ensaios relativamente simples que quantificam a elongação da zona apical de plúmulas de cereais (como trigo, neste caso), em presença de meio líquido onde se incorporam os agentes fitotóxicos. Este ensaio, dada sua sensibilidade, tem sido proposto como passo prévio da avaliação de agentes herbicidas (Sánchez 2002).

Foram utilizados coleóptilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L.) da variedade Cortez, proveniente de 100 sementes que cresceram durante 5 dias na ausência de luz, e umedecidos com 15 mL de água destilada. Depois desse período, sob luz verde, foram extraídos fragmentos com 4 mm de comprimento a partir do epicótilo, com auxílio de lâminas de corte. Os coleóptilos foram incubados numa solução tampão de crescimento que mantinha o pH constante nas condições adequadas para o crescimento. Essa solução era composta de ácidos cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,6. A partir de 9,6 mg de extrato ou fração a ser testada, foram preparadas soluções nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm, nessa solução tampão. Os extratos apresentavam dificuldades de se dissolverem na solução de crescimento e, para isso, utilizou-se dimetilssulfóxido (DMSO), na concentração de 5 µl /mL, que facilitou a solubilidade dos extratos em água. Os testes foram feitos com 5 fragmentos de coleóptilo por tubo de ensaio, que continha 2 mL de solução, e cada tratamento foi realizado em triplicata. O controle negativo foi feito apenas com solução tampão DMSO e o controle positivo com herbicida LOGRAN<sup>®</sup>, comercializado pela empresa SYNGENTA (composto por 59% de terbutrina, 0,6% de triasulfurona e agentes

veiculares). Os tubos foram dispostos em um rotor na horizontal e com giro contínuo com rotação de 6 rpm, com ausência de luz. Após 24 horas, os fragmentos eram então retirados, dispostos em uma planilha e fotografados para serem medidos com auxílio do programa Photomed<sup>®</sup>. As medidas eram comparadas com o controle negativo e analisadas em porcentagem de inibição (Figura 2.3).

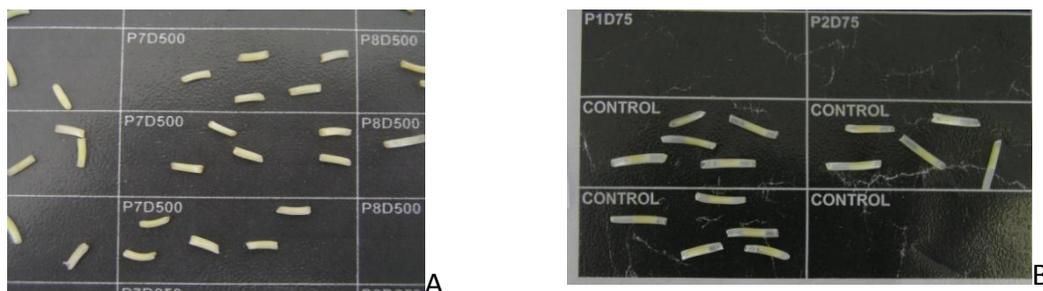


Figura 2.3. Inibição dos coleótilos com o uso do herbicida comercial Logran<sup>®</sup> (A) em comparação com controle (B).

#### BIOENSAIO DE SEMENTES

Neste bioensaio com sementes, foram utilizados 26 mg de cada um dos extratos e frações obtidas e descritas anteriormente. A essa quantidade foi adicionado DMSO numa proporção de 5  $\mu$ L/mL e preparadas soluções de 800, 400 e 200 ppm da cada extrato e frações a serem testadas.

Para bioensaio com sementes, utilizaram-se 4 espécies modelo, sendo as dicotiledôneas agrião (*Lepidium sativum* L. -Cruciferae), alface (*Lactuca sativa* L.-Asteraceae) e tomate (*Solanum lycopersicum* L. -Solanaceae), além da monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L. -Alliaceae). Este bioensaio realizou-se com quatro repetições, em placa de Petri (4 cm de diâmetro) sobre papel Whatman n<sup>o</sup> 1 como substrato, onde foram adicionadas 20 sementes por placa. A germinação e o crescimento ocorreram em solução aquosa, tamponada mediante o uso de solução de 10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH a pH=5,6. O volume de solução para cada placa de Petri era de 1 mL. Quando se adicionaram as sementes e as soluções dos compostos a serem testados nas placas, estas foram seladas com Parafilm<sup>®</sup> e incubadas em câmara de crescimento Memmert IC 700, com ausência de luz, a 25 °C. As placas foram mantidas nessas condições durante quatro, cinco, seis e sete dias, respectivamente, para as sementes de agrião, tomate, alface e cebola. Decorridos os

períodos de crescimento acima mencionados, as placas foram armazenadas a -10 °C durante 24 horas para deter o crescimento. O congelamento favoreceu a manipulação das plântulas, assim se evitou que se produzissem torções tanto nas radículas como na parte aérea, além de permitir que as medições pudessem ser realizadas em dias distintos. Uma vez descongeladas e esticadas, utilizou-se o programa FITOMED<sup>®</sup> para realizar as medições dos parâmetros de longitude da raiz e da parte aérea.

Neste bioensaio, utilizou-se como controle positivo o herbicida comercial com atividade conhecida LOGRAN<sup>®</sup>. Os valores obtidos para cada um dos parâmetros considerados (porcentagem de germinação e longitude da raiz e parte aérea) foram comparados com o controle negativo, que continha somente a solução tampão com DMSO.

### PROCESSAMENTO DOS DADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para o bioensaio de atividade geral (coleóptilo), as três réplicas foram medidas separadamente para avaliar a média total e o desvio padrão da amostra. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição do alongamento segundo a fórmula abaixo:

Porcentagem de inibição

$$\%inibição = \left( \frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) \times 100\%$$

Onde  $\bar{X}T$  é a média de alongamento dos tratamentos e  $\bar{X}C$  a média de alongamento do controle.

Os resultados são mostrados em um gráfico de barras onde o “0” representa a longitude do controle. Os valores positivos indicam estimulação dos parâmetros medidos e os negativos, inibição dos mesmos.

Por outra parte, os parâmetros avaliados nos bioensaios de fitotoxicidade foram a porcentagem de germinação de sementes por placas, a longitude da raiz e da parte aérea. Para germinação, a distribuição das variáveis é o número de sementes por placa e para a raiz e parte aérea, a distribuição empregada foram as medidas de cada variável

em cada placa, conhecida como distribuição de médias. Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (branco). O valor “0” representa o controle. Qualquer valor positivo implica em estimulação dos parâmetros medidos e os valores negativos, inibição.

As médias foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas entre si pelo teste de comparação de média Tukey 5%, através do programa SISVAR<sup>®</sup>.

---

## PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS

O extrato diclorometânico e de acetona, obtidos a partir da extração direta do pó da folha de lobeira, foram submetidas ao fracionamento cromatográfico. Essa escolha se baseou na boa atividade do extrato de diclorometano, tanto da extração direta como do fracionamento líquido-líquido. Estes foram submetidos a uma separação inicial em coluna cromatográfica de sílica gel Merck (0,06 – 0,2 mm) como fase estacionária em pressão atmosférica. Utilizou-se como fase móvel Hx e AcOET em diferentes proporções de 0 a 100%, eluindo posteriormente com MeOH. Desse fracionamento, foram obtidas 18 frações de cada um dos extratos analisados e estas foram reunidas de acordo com observações em CCD. As frações foram purificadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O CLAE utilizado era da marca *MERCK HITACHI* equipado com canais de detecção L-7490. Os solventes foram impulsionados por bombas de 3 canais *LaChrom L-7100*. Os cromatogramas se processavam mediante o software *MERCK HITACHI D-7000*. As colunas de fase normal utilizadas foram semipreparativas (preenchimento Li Chrospher SiO<sub>2</sub>, Merck, 7 e 10 µm, dimensões 250 x 10 mm) e analíticas (preenchimento Li Chrospher SiO<sub>2</sub>, Merck, 5 µm, dimensões 250 x 4 mm). O fluxo do eluente foi de 3 mL/min para coluna semipreparativa e 1 mL/min para a analítica.

A CCD foi utilizada durante todo o processo de purificação. As placas tinham 0,25 mm de espessura, com indicadores fluorescentes da marca Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> (Machery Ángel). A cromatografia se seguia por análise no UV (254 e 360 nm) e por reveladores. Os reveladores usados foram *Oleum* (solução de ácido sulfúrico, água e ácido acético 1:4:20) e anisaldeído (solução de etanol, anisaldeído, ácido sulfúrico, ácido acético, na proporção 450:25:25:10) e posteriormente aquecidos a 150 °C.

Os compostos isolados e purificados foram submetidos a análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN<sup>1</sup>H). Os espectros de RMN foram registrados no equipamento VARIAN *INOVA* 400 e utilizados solventes deuterados conforme a solubilidade da amostra. Para a calibração do deslocamento químico,  $\delta$  (expresso em ppm) e a constante de acoplamento foram referenciados em relação ao pico residual dos solventes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DAS FOLHAS JOVENS DE LOBEIRA

O rendimento total das frações obtidas a partir de 120 g de pó das folhas com a extração direta com solventes (que serão chamadas de extratos) e 348 g do fracionamento líquido-líquido está (que serão chamadas de frações) representada na Figura 3.3.

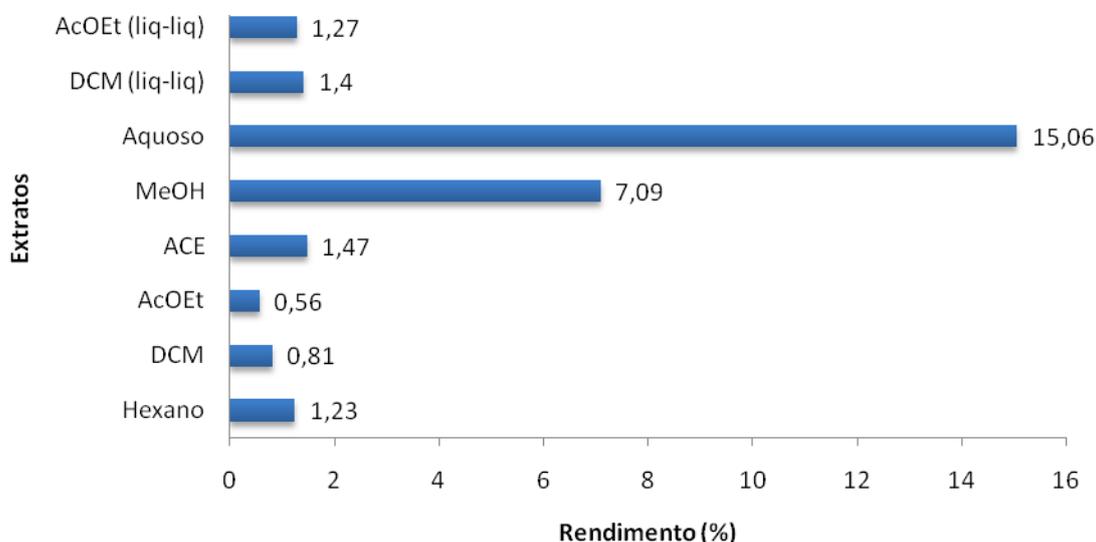


Figura 3.3. Rendimento em % dos extratos do pó das folhas de *S. lycocarpum*. Fracionamento líquido-líquido de acetato de etila -AcOEt (líq-líq)- e diclorometano -DCM (líq-líq); extrações diretamente das folhas aquoso, metanol (MeOH), Acetona (ACE) Acetato de etila (AcOEt), Diclorometano (DCM) e Hexano.

Os extratos aquosos e metanólico foram os que tiveram maior rendimento se comparado com as outras extrações. Isso porque grande parte dos açúcares e produtos glicosilados presentes no pó da folha são extraídos nesses dois solventes.

#### BIOENSAIO DE COLEÓPTILO

O resultado do crescimento do coleóptilo de trigo nos diferentes extratos e frações pode ser visualizado na Figura 4.3. Todas as frações obtidas por extração líquido-líquido apresentaram as maiores inibições observadas. A inibição se manteve alta mesmo nas concentrações mais baixas, comportamento também observado para o efeito do herbicida comercial Logran<sup>®</sup> no desenvolvimento dos coleóptilos.

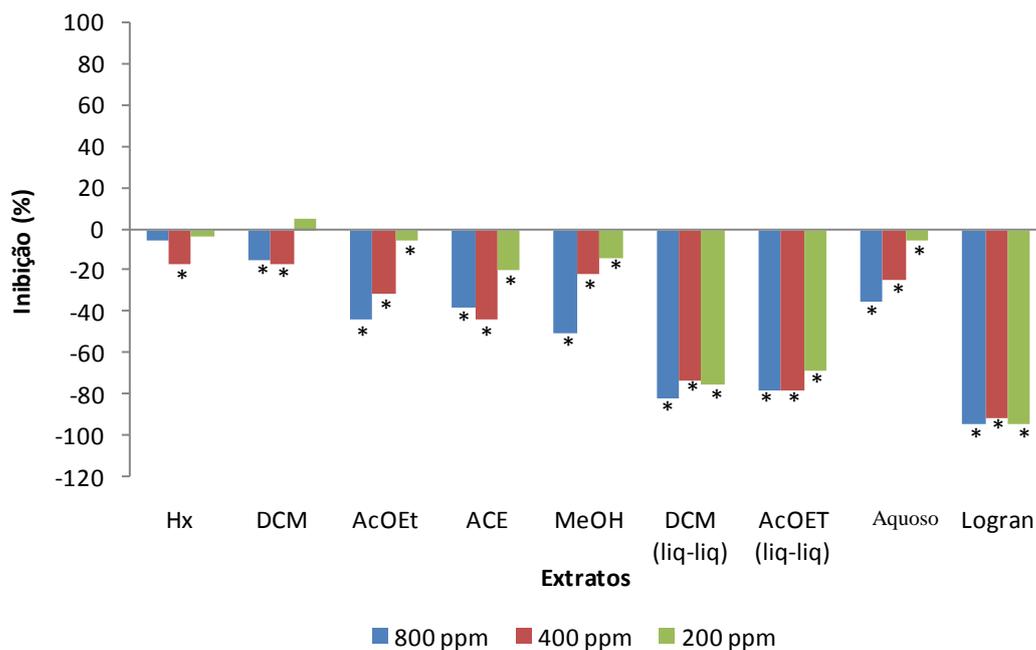


Figura 4.3. Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum*), durante 24 horas de crescimento no escuro, em contato com diferentes extratos e frações de folhas de *S. lycocarpum*. Fracionamento líquido-líquido de acetato de etila -AcOEt (líq-líq)- e diclorometano -DCM (líq-líq); extrações diretamente das folhas: aquoso, metanol (MeOH), Acetona (ACE) Acetato de etila (AcOEt), Diclorometano (DCM) e Hexano (Hx). \*Indica diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significancia.

Dentro das extrações diretas com solventes orgânicos, os extratos de acetato de etila, metanol e aquoso apresentaram atividade inibitória em todas as concentrações analisadas, numa relação dose-dependente. O resultado com o extrato de acetona na concentração intermediária (400 ppm) apresentou uma atividade inibitória maior que a concentração mais alta, não apresentando uma relação dose-dependente clássica, nos trabalhos de alelopatia e fitotoxicidade. Uma das justificativas poderia ser a questão da solubilidade desses extratos em água que, mesmo com auxílio do DMSO e ultrassom, apresentava dificuldades. A fração de diclorometano na concentração mais baixa (200 ppm) apresentou estímulo de crescimento e o extrato hexânico apresentou atividade modesta.

Esse resultado preliminar com coleóptilo de trigo sugere que os compostos ativos do pó da folha de lobeira possam estar localizados nas frações líquido-líquido. Essas frações são livres de clorofila, algo que facilitou o trabalho de purificação já que

as clorofilas contaminavam todas as amostras. Mas ao mesmo tempo, estas frações apresentaram rendimento muito baixo.

Os bioensaios utilizando fragmentos de coleóptilos de trigo estiolados têm se mostrado uma alternativa interessante para os estudos de alelopatia e fitotoxicidade e uma ferramenta fundamental para os os isolamentos biodirigidos. Atraves desse teste, em apenas 24 horas, é possível ter um resultado de um bioensaio com atividade geral, já que os efeitos são apenas no alongamento celular de células ainda indiferenciadas desses coleóptilos. Trabalhos como de Macías *et al.* (2005) e (2006a) mostram o uso desse bioensaio como uma ferramenta importante para estudo de estrutura-atividade de compostos com potencial herbicida e, em Macías *et al.* 2006b, a atividade desse bioensaio e de fitotoxicidade (com semente) foram realizadas em conjunto para os mesmos compostos, o que mostra a confiabilidade do método.

---

#### BIOENSAIO DE SEMENTES

Para melhor análise dos dados, a avaliação do efeito fitotóxico dos extratos e frações das folhas trituradas de lobeira foram separados em germinação e crescimento.

---

#### EFEITO NA GERMINAÇÃO

Em relação aos bioensaios com sementes de agrião, três extratos e uma fração se mostraram ativos na inibição da germinação em relação ao controle, sendo elas: acetato de etila, acetona, metanol e acetato de etila líquido-líquido (Figura 5.3). O que chama a atenção nesses resultados é a alta atividade que a fração acetato de etila líquido-líquido causou na inibição da porcentagem de germinação de sementes de agrião, em relação ao controle. Essa inibição alcançou os 85% na concentração de 400 ppm, inibição maior que o próprio herbicida Logran<sup>®</sup>. Essa inibição elevada, que fugiu do padrão de resposta dose-dependente da concentração, pode ter sido causada por um problema de solubilidade da fração em água, que pode ter alterado a concentração original pela presença de material em suspensão. Mesmo com o uso do DMSO e ultrassom, essas frações e/ou extratos de baixa polaridade apresentavam dificuldade na sua solubilização no tampão usado no bioensaio.

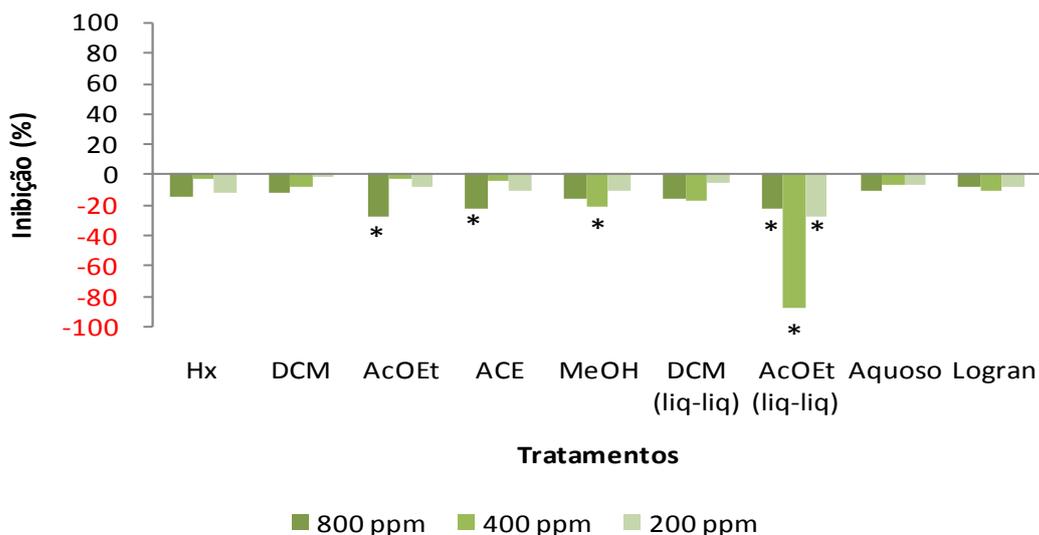


Figura 5.3. Inibição da germinação de sementes agrião (*Lepidium sativum* L) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante 4 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

As sementes de agrião germinam uniformemente e em um curto intervalo de tempo, o que facilita a otimização de bioensaios para os estudos de fitotoxicidade utilizando essa espécie. Agrião já se mostrou sensível a outros aleloquímicos (Hasegawa *et al.* 1992; Kato-Noguchi *et al.* 2002) e é uma espécie interessante para ser usada nos ensaios de alelopatia, tanto que é uma das espécies sugeridas por Macías (2000b) como espécies-alvo na padronização de bioensaios.

A germinação das sementes de tomate foi que demonstrou maior sensibilidade aos compostos presentes nos extratos e frações da folha de lobeira (Figura 6.3). As duas frações líquido-líquido produziram uma alta inibição da germinação das sementes de tomate, mesmo na menor concentração (200 ppm). Essa inibição foi superior a 80% em relação ao controle, muito maior do que a causada pelo herbicida Logran<sup>®</sup>. Os outros extratos apresentaram uma inibição na seguinte ordem: acetona, aquoso, acetato de etila e diclorometano, numa relação dose-dependente da concentração. O extrato que chamou a atenção foi o de metanol, que apresentou uma inversão nessa relação dose-dependente da concentração.

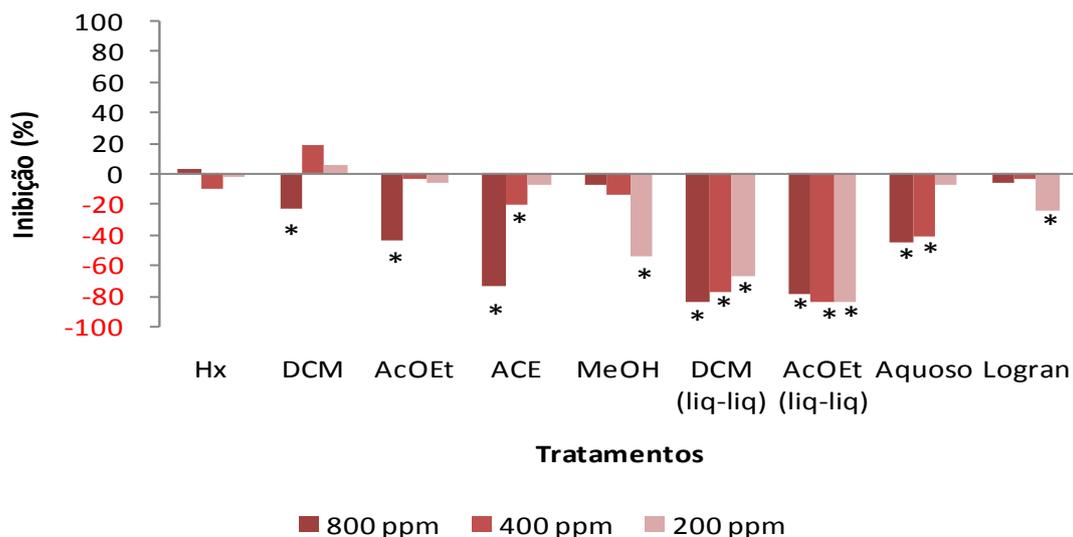


Figura 6.3. Inibição da germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*), durante 5 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Sementes de tomate têm sido utilizadas em bioensaios de alelopatia como espécies-alvo com êxito (El-Khatib *et al.* 2004; Manoel *et al.* 2009). Wandscheer & Pastorini (2008) utilizaram sementes de alface e tomate como espécies-alvo do seu experimento e as sementes de tomate mostraram menos sensíveis do que as sementes de alface, tradicionalmente utilizadas em bioensaio de alelopatia. Tomate é da mesma família e gênero da lobeira, e essa sensibilidade maior dessa semente aos extratos do pó da folha poderia ser um indicador de efeito autotóxico desse extrato para os membros do mesmo gênero. Isso de fato poderia ser comprovado caso mais testes com outras sementes da mesma família e gênero (p ex. berinjela, batata, pimentão, jiló etc) além de sementes da própria espécie, fossem realizados com os extratos da folha de lobeira.

Usualmente, a espécie-alvo mais empregada nos ensaios alelopáticos é a semente de alface. Essa tem sido usada extensivamente devido à sua germinação rápida e alta sensibilidade (Macías *et al.*, 2000b). Para os extratos e frações do pó da folha de lobeira, não foi bem isso o observado quando se analisou o efeito na germinação (Figura 7.3). A germinação das sementes não foi afetada significativamente pela presença dos

extratos e frações, indicando uma baixa sensibilidade aos compostos ali presentes, se comparado com sementes de tomate (Figura 6.3).

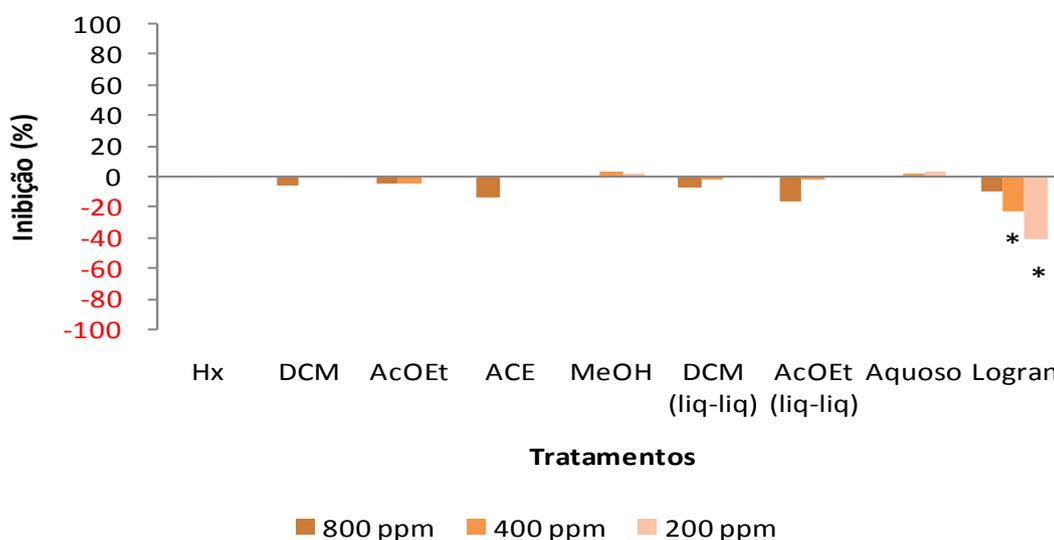


Figura 7.3. Inibição da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante 6 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

O efeito dos extratos e frações na germinação em sementes de cebola não foi observado em nenhum dos tratamentos, inclusive do herbicida Logran<sup>®</sup> (Figura 8.3). Essa espécie é uma monocotiledônea, assim como um grande número de plantas invasoras, e a sua germinação não sofre influência dos compostos presentes no pó da folha de lobeira. As sementes de cebola também são usadas como espécie-alvo para ensaios alelopáticos (Abdelgaleil & Hashinaga 2007). Parvez *et al.* (2004) testaram várias espécies agrônômicas na atividade alelopática de casca e sementes de *Tamarindus indica* L. Entre todas as espécies avaliadas, a cebola se mostrou a menos sensível, mostrando mais uma vez a pouca sensibilidade dessa espécie, pois os mesmos extratos inibiram significativamente outras sete espécies de plantas invasoras utilizadas como alvos.

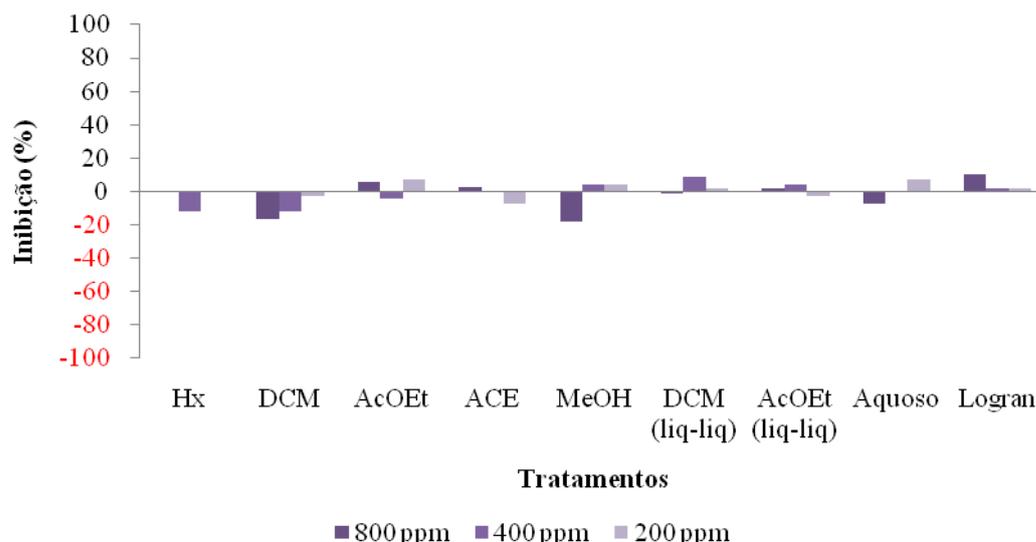


Figura 8.3. Inibição da germinação de sementes de cebola (*Allium cepa* L), sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*), durante 7 dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Em relação às sementes-alvo utilizadas, as sementes de tomate foram as mais sensíveis, quando se analisa o efeito na germinação. As sementes de agrião foram menos sensíveis e, as sementes de alface e cebola mostraram-se insensíveis aos extratos e frações do pó das folhas de lobeira.

Dos extratos e frações testados, e analisando apenas a semente que foi afetada (tomate), as frações líquido-líquido foram as mais ativas, melhor até que o herbicida Logran<sup>®</sup>. Essa fração é então a recomendada para seguir a marcha de purificação e identificação dos compostos presentes.

A germinação de sementes é amplamente utilizada nos bioensaios alelopáticos e, na literatura, o uso desse bioensaio é em geral adequado para determinação da atividade alelopática entre espécies, como tem sido citado por Leather & Einhelling (1986), Inderjit (1995) e Romeo & Weidenhamer (1988). Muitos trabalhos são centrados em poucas plantas, especialmente sementes de espécies agrícolas para descobrir aspectos bioquímicos e fisiológicos da germinação. Por essa razão, a questão é como estender os resultados obtidos em laboratório com sementes selecionadas pela mão humana e este

poder ser extrapolado para plantas nativas e em condições de campo (Aliotta *et al.* 2006).

O número final de sementes germinadas, no caso aqui avaliada a germinabilidade, é um parâmetro normalmente pouco sensível à presença de aleloquímicos. Para que a germinação ocorra, são necessários apenas água, oxigênio e temperatura adequados uma vez que nenhuma das espécies estudadas apresentava algum tipo de dormência. Vale lembrar que o parâmetro de germinação adotado nesse trabalho foi de protrusão da radícula com pelo menos 2 mm. O tempo médio de germinação é um parâmetro mais sensível à presença de aleloquímicos porque muitos deles permitem que a semente germine, mas com um pequeno atraso, seja devido à presença de aleloquímicos com essa função, seja pelo efeito osmótico dos extratos (Oliveira *et al.* 2004a, 2004b).

---

#### EFEITO NO CRESCIMENTO

As plântulas de agrião apresentaram maior inibição no crescimento da raiz e parte aérea se comparado com a germinação, algo já bem relatado nos experimentos de alelopatia (Gatti, *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004ab) (Figura 9.3). No crescimento da parte radicular, os extratos que se mostraram com melhor atividade foram acetato de etila, acetona e a fração acetato líquido-líquido. Já na parte aérea, a sensibilidade foi maior e os extratos mais ativos foram acetona, metanol e aquoso e as frações diclorometano e acetato de etila líquido líquido. A maior sensibilidade da parte aérea do agrião em relação à parte radicular pode ser observada nos extratos e frações em alta concentração, havendo estímulo de crescimento em alguns tratamentos. As inibições do crescimento da parte aérea por extratos e frações mais ativas foram expressivas se comparadas com o efeito observado pelo herbicida Logran<sup>®</sup>, mostrando uma sensibilidade dessa espécie aos aleloquímicos presentes.

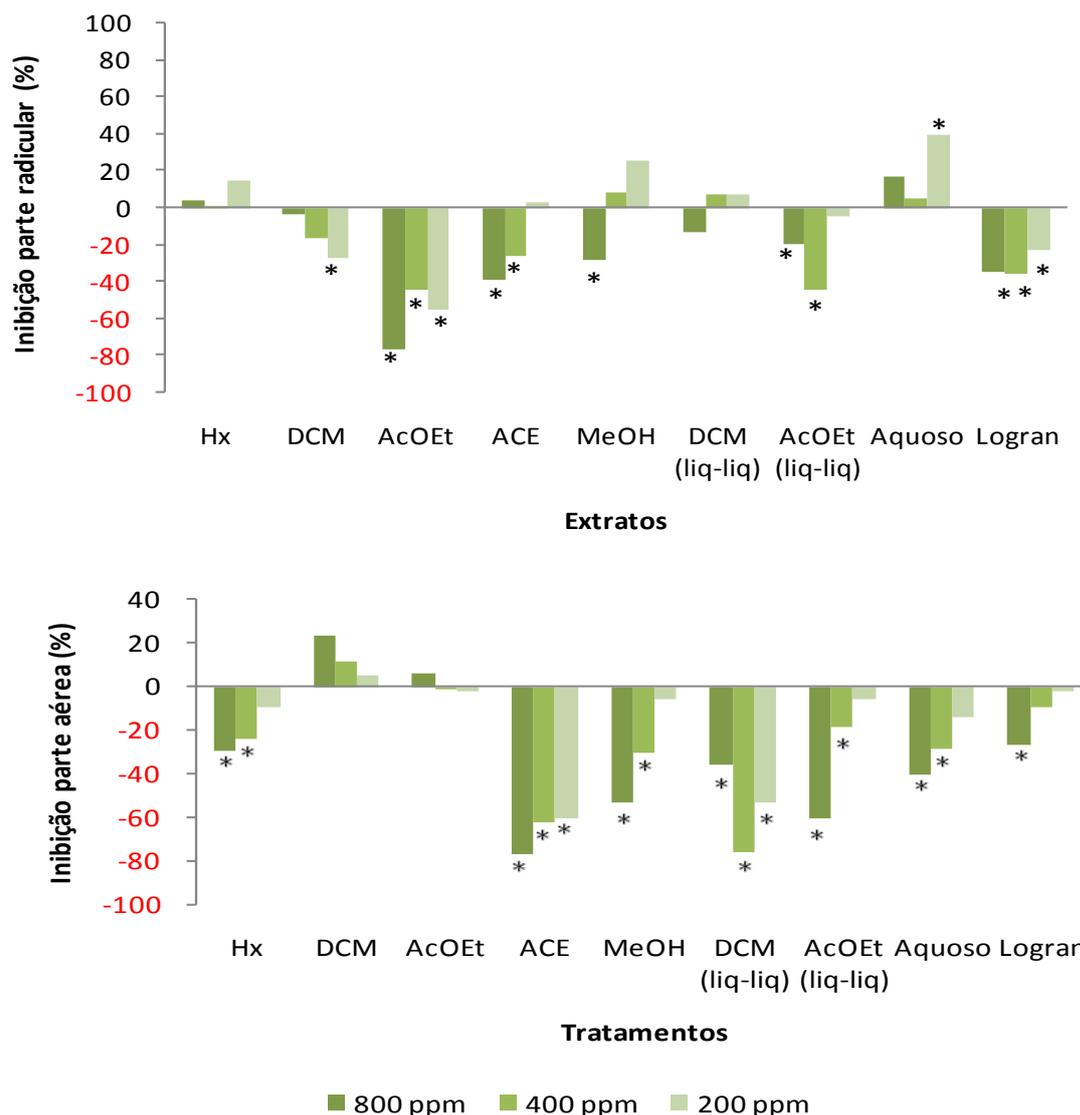


Figura 9.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de agrião, crescidas durante quatro dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM líq-líq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Um efeito fitotóxico mais acentuado foi registrado em tomate (Figura 10.3). As frações de DCM (líq-líq) e AcOEt (líq-líq) apresentaram inibições maiores que o herbicida Logran<sup>®</sup>, mesmo em baixas concentrações para o crescimento da parte radicular. As partes aéreas e radiculares sofreram inibição na presença da maioria dos extratos, exceto o extrato hexânico.

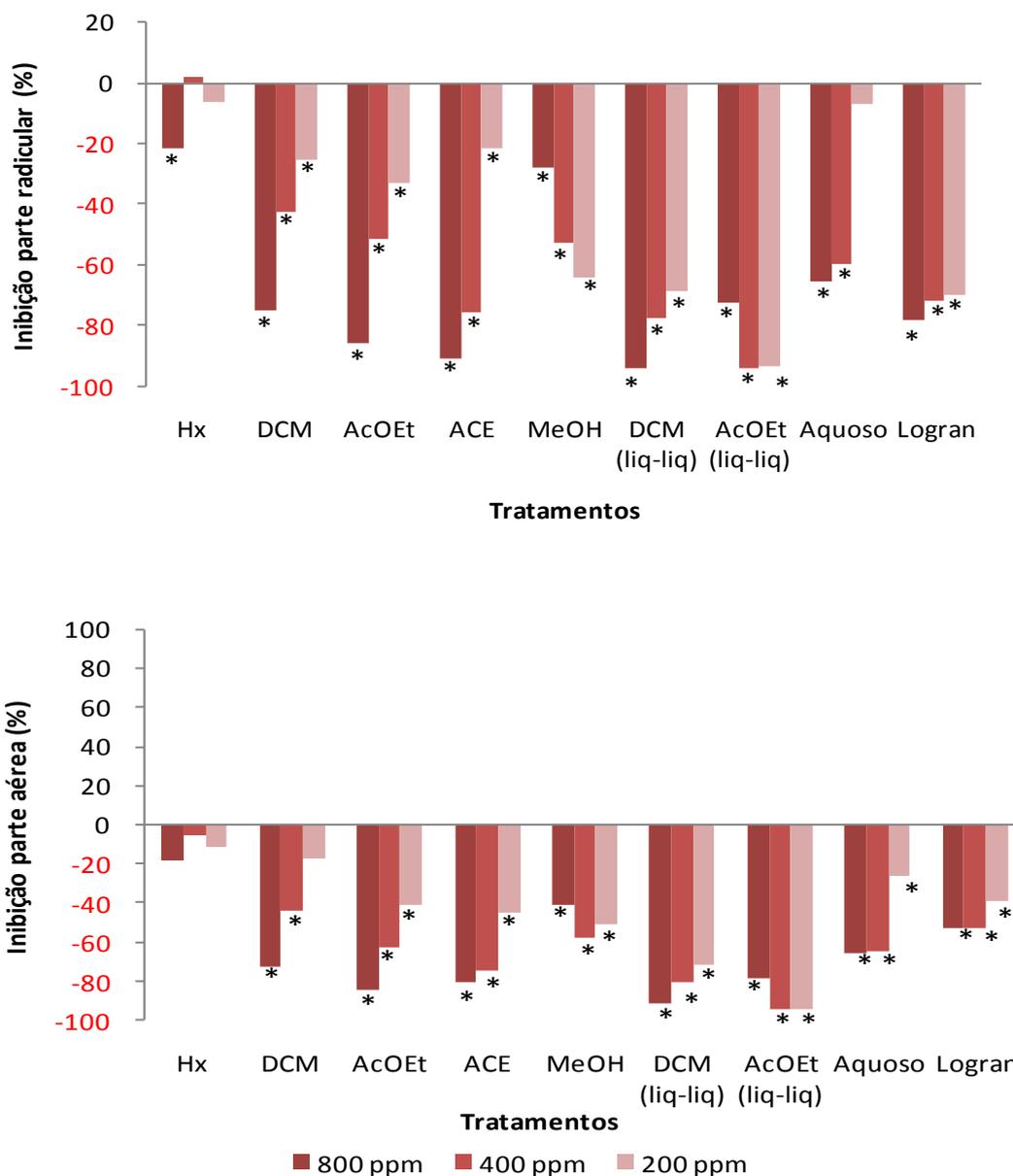


Figura 10.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de tomate, crescidas durante cinco dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

O efeito produzido pelo extrato metanólico na germinação e no crescimento da raiz foi algo que chamou a atenção, uma vez que se observou um maior efeito inibitório em baixa concentração do extrato. O extrato metanólico é o mais estudado na fitoquímica do gênero *Solanum* (Ye *et al.* 2001; Fukuhara *et al.* 2004; Nakamura *et al.* 2008), sendo os produtos mais encontrados nesses extratos os glicosídeos esteroidais e os glicoalcalóides. Esse comportamento inverso do efeito dose-dependente da

concentração pode estar relacionado à dificuldade de absorção dos compostos presentes nesse extrato em altas concentrações. Já nas concentrações mais baixas, a absorção dos aleloquímicos teria melhor eficiência e com isso um maior efeito inibitório. Isso mostra uma possível relação entre os carreadores de membrana e os compostos fitotóxicos presentes nesse extrato. Os carreadores que levam os aleloquímicos também podem transportar outros compostos presentes no extrato como açúcares e outros. Assim, em alta concentração, haveria uma grande competição pelo sítio de ligação dos carreadores, diminuindo assim a entrada dos compostos ativos e, conseqüentemente, causando menor inibição.

Mesmo que vários trabalhos tenham demonstrado a sensibilidade de sementes de alface aos aleloquímicos (Alves *et al.* 2004; Gatti *et al.* 2004; Maraschin-Silva & Aquila 2006; França *et al.* 2008), esse comportamento não foi observado para os extratos provenientes de folha de lobeira (Figura 11.3). Isso ressalta a importância do uso de várias espécies vegetais para averiguar a atividade fitotóxica, uma vez que elas podem apresentar sensibilidade variada de acordo com o tipo de extrato. Mesmo que a inibição em sementes de alface tenha sido menor, fica evidente que a raiz é o órgão mais atingido pela presença dos extratos.

Outros trabalhos também evidenciaram que as raízes são mais sensíveis aos aleloquímicos, quando comparadas com a parte aérea das plantas (Abdelgaleil & Hashinaga 2007; Ercoli *et al.* 2007; Parvez *et al.* 2003; Punjani *et al.* 2006). Além disso, em ambiente de Cerrado, possuir um sistema radicular em bom funcionamento é uma forma de garantir a sobrevivência em um ambiente com escassez de água durante parte do ano e as plantas afetadas por esses compostos produzidos pela folha de lobeira podem ter seu estabelecimento comprometido neste ambiente. Os extratos mais ativos para inibição do crescimento da raiz foram AcOEt, ACE e MeOH.

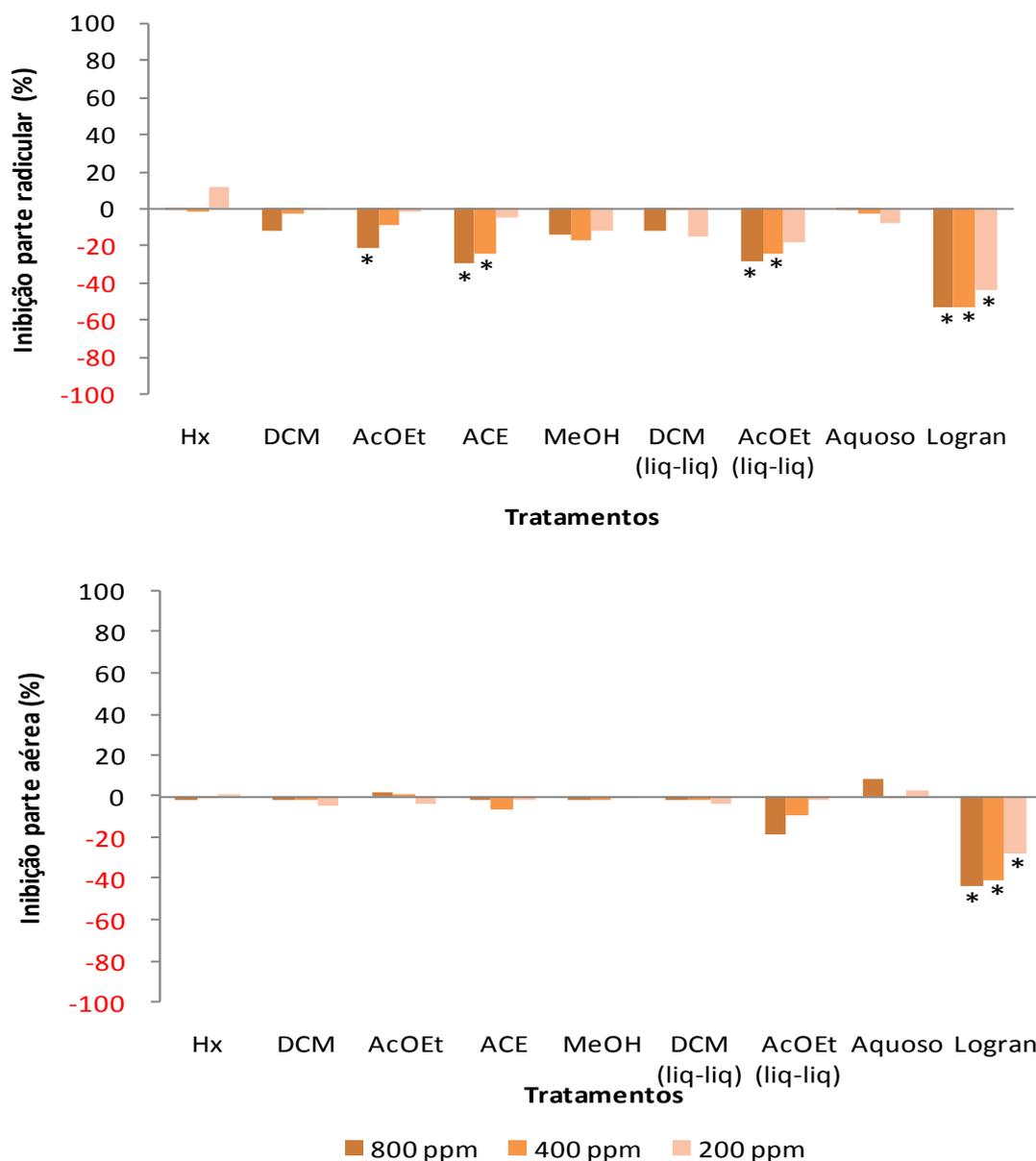


Figura 11.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de alface, crescidas durante seis dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran<sup>®</sup>. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Em cebola, o extrato de AcOEt e a fração de AcOEt (líq-líq) mostraram-se mais ativos na inibição do crescimento da parte radicular e DCM, ACE e as duas frações líquido-líquido afetaram o crescimento da parte aérea (Figura 12.3). Como para germinação, cebola também demonstrou pouca sensibilidade aos extratos e frações da folha de lobeira. Essa espécie é um representante das monocotiledôneas e as gramíneas

são dominantes no extrato sub-arbusto onde normalmente ocorre esta espécie (observação pessoal). Esse resultado reforça essa observação, indicando a pouca influência alelopática das folhas para espécies de monocotiledôneas, o que mostra uma seletividade dos extratos e frações quanto ao seu modo de ação.

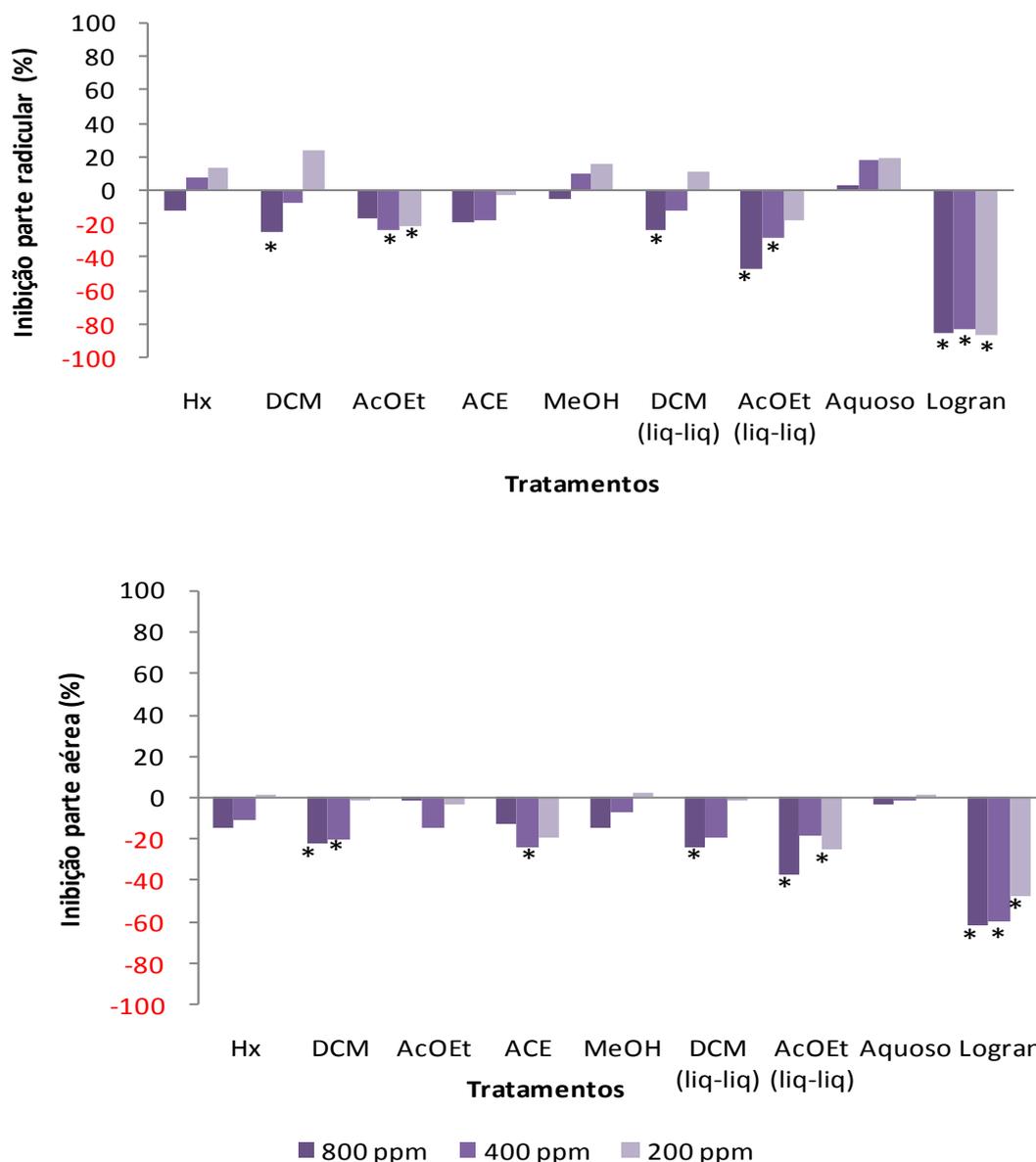


Figura 12.3. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de cebola, crescidas durante sete dias, sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). Frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt líq-líq) e aquoso. Herbicida comercial Logran®. \* Indica diferenças significativas em relação ao controle.

Embora a germinação da semente, em condições de campo, possa garantir o estabelecimento das espécies, o estágio de plântula é o período mais susceptível à influência de fatores externos como a influência dos aleloquímicos (Fenner 2000; Adkins *et al.* 2007).

O efeito inibitório mais expressivo em sementes de tomate, tanto na germinação quanto no crescimento, nos mostra o possível efeito autotóxico desses extratos dentro do mesmo gênero. Evidências de autotoxicidade foram relatadas inicialmente em 1907, quando se verificou que raízes de trigo, aveia e outras plantas cultivadas liberavam compostos químicos que inibiam suas próprias plântulas (Shereiner & Reed 1907 *apud* Wu *et al.* 2007). Desde então, a autotoxicidade tem sido observada para muitas culturas agrícolas, como alfafa (Hedge & Miller 1990), arroz (Chou & Chou 1979), cevada (Oueslati *et al.* 2005) e trigo (Young *et al.* 1989) e tem sido uma ferramenta importante para o planejamento de uma rotação de cultura.

O significado ecológico da autotoxicidade está envolvido na distribuição geográfica, adaptação para induzir dormência e prevenção da mortalidade de sementes e propágulos (Friedman & Waller 1983). Em ambientes naturais, também há a evidência de autotoxicidade, o que mostra uma forma eficiente de um autocontrole populacional, inibindo a germinação e o crescimento inicial de plântulas (Alías *et al.* 2006; Everin & Wetzel 2000; Perry *et al.* 2005). Na silvicultura, autotoxinas da litera e do húmus inibem o restabelecimento de várias coníferas de importância econômica, como *Picea abies* e *Cunninghamia lanceolata* (Chen *et al.* 2005; Mallik 2002). Em vários casos, a autotoxina inibe o crescimento de plantas junto com outros fatores como patógenos e a importância ecológica da autotoxicidade varia espacialmente e temporalmente (Wu *et al.* 2007; Sinkkonen 2007).

O efeito dos extratos e frações aqui estudados pode ser devido a várias alterações provocadas pelos aleloquímicos, em vários processos fisiológicos ao mesmo tempo, o que dificulta separar os efeitos primários e secundários desses compostos presentes em extratos e frações da folha de lobeira. Há um aumento das evidências de que os aleloquímicos podem agir em diversas frentes como a divisão celular, diferenciação celular, absorção de água e íons, balanço hídrico, metabolismos dos fitohormônios, respiração, fotossíntese, funcionamento enzimático, transdução de sinal bem como na expressão gênica (Singh & Thapar 2003; Inderjit & Duke 2003; Belz & Hurlle 2004). É

possível que os aleloquímicos tenham produzido um ou mais efeitos no processo celular que tenha resultado na redução do crescimento. Todavia, o detalhamento dos mecanismos bioquímicos nos quais um composto age com efeito tóxico no crescimento vegetal não são bem conhecidos (Zhou & Yu 2006) dependendo do grupo de composto analisado.

---

## PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Após análise dos bioensaios de coleóptilo e de sementes, observou-se que houve uma variação dos extratos e frações mais ativos. A fração diclorometano líquido-líquido mostrou-se com boa atividade na maioria dos testes realizados, embora o rendimento da fração tenha sido baixo. Comparando, em cromatografia de camada delgada (CCD), essa fração com o extrato de diclorometano, os produtos majoritários eram os mesmos, embora nesse extrato se observassem maiores impurezas como ceras e clorofilas, algo não observado na fração líquido-líquido. Por esse motivo, o extrato de diclorometano foi escolhido para ser fracionado.

Outro extrato fracionado foi o de acetona que também se mostrou com atividade no bioensaio de sementes e de coleóptilo de trigo e este também foi fracionado e purificado. Os resultados desse fracionamento e purificação estão relatados a seguir.

---

### EXTRATO DE DICLOROMETANO

Para o fracionamento do extrato, foi aplicado 400 mg de amostra em uma coluna de sílica gel com diâmetro de 2,5 cm e altura de 30cm. A fase móvel foi uma mescla de polaridade crescente de hexano:acetato de etila e a lavagem com metanol. Do fracionamento deste extrato, foram obtidas 18 frações, seguindo como critério a analogia CCD. Dessas 18 frações, apenas sete apresentavam quantidade em massa e produtos possíveis de purificação. As frações encontram-se na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de diclorometano das folhas jovens de *S. lycocarpum*.

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Eluente*</i> <i>(Hx:AcOEt)</i>	<i>Produtos</i>
3	71,2	5-10%	P1, P2, P3, P4
4	28,6	10%	P5, P6, P7
5	13,9	10%	P8
6	15,1	15%	P9
14	43,6	50%	P10
15-16	24,6	70-80%	P11

\*o eluente é a mescla de solvente hexano e acetato de etila em que a fração foi coletada durante o fracionamento em coluna cromatográfica.

Em seguida, cada uma das frações foi submetida à purificação e cada procedimento está descrito abaixo.

### **Estudos da fração 3**

A fração 3 (71,2 mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 5% como eluente, obtendo-se 1,0 mg de P1, 3,5 mg de P2, 4,2 mg de P3 e 26,0 mg de P4. Os espectros de RMN<sup>1</sup>H dos produtos encontram-se nas páginas 145 a 148.

### **Estudos da fração 4**

A fração 4 (28,6 mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 10% como eluente e obtendo 0,9 mg de P5, 1,0 mg de P6 e 1,0 mg de P7. Os RMN<sup>1</sup>H dos produtos encontram-se nas páginas 149 a 151.

### **Estudos da fração 5**

A fração 5 (13,9 mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 10% como eluente, obtendo-se 8,3 mg de P8. Os espectros de RMN<sup>1</sup>H do produto encontra-se na página 152.

### **Estudo da fração 6**

A fração 6 (15,1mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 20% como eluente, obtendo-se 1,6 mg de P9. O espectro de RMN<sup>1</sup>H do produto encontra-se na página 153.

### **Estudo da fração 14**

A fração 14 (43,6 mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 20% como eluente, obtendo-se 20,1 mg de P10. O espectro de RMN<sup>1</sup>H do produto encontra-se na página 154.

### **Estudo da fração 15-16**

As frações 15-16 (24,6 mg) foram purificadas em CLAE com coluna semipreparativa e Hx/AcOEt a 70% como eluente, obtendo-se 3,0 mg de P11. O espectro de RMN<sup>1</sup>H do produto encontra-se na página 155.

Nem todos os produtos puderam ser identificados devido a limitação e quantidade e de grau de pureza. Mesmo assim, os espectros são apresentados visando mostrar um aspecto geral dos compostos encontrados nas frações analisadas. Os produtos para os quais foi possível realizar análise espectroscópica e identificação, graças ao seu grau de pureza e quantidade, foram P7, P8, P9 e P11, nomeados  $\alpha$ -amirina, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e oleato glicerol, respectivamente.

Para caracterização e identificação dos compostos empregaram-se técnicas espectroscópicas. Uma vez obtidos os espectros, esses resultados foram idênticos aos publicados previamente na bibliografia para estigmasterol (Gracian-Tours & Martel 1969),  $\beta$ -sitosterol (Della *et al.* 1990) e  $\alpha$ -amirina (Asiff & Sabir 2003). Para oleato glicerol, os dados espectroscópicos foram comparados com uma biblioteca que continha espectros de massa de substâncias previamente conhecidas, identificando-a desta maneira.

Do extrato de acetona, aplicou-se uma amostra de 1,5g em uma coluna de sílica gel de 6 cm de diâmetro e 21 cm de altura. Essa foi eluída com a mescla hexano:acetato de etila em ordem crescente de polaridade e lavada com metanol. Do fracionamento deste extrato, foram obtidas 16 frações, seguindo como critério a analogia por CCD. Dessas, apenas duas frações apresentavam quantidade em massa e produtos possíveis de separação. As frações encontram-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de acetona das folhas jovens de *S. lycocarpum*.

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Eluente*(Hx:AcOEt)</i>	<i>Produtos</i>
11	31,9	40%	P12, P13 e P14
15-16	24,2	80%	P15

\*O eluente é a mescla de solvente hexano:acetato de etila em que a fração foi coletada durante o fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel.

### **Estudo da fração 11**

A fração 11 (31,9 mg) foi purificada em CLAE com coluna semipreparativa e clorofórmio/metanol 0,5% como eluente, obtendo-se 3,0 mg de P12, 5,0 mg de P13 e 7,7 mg de P14. Os espectros de RMN<sup>1</sup>H dos produtos encontram-se nas páginas 156 a 158.

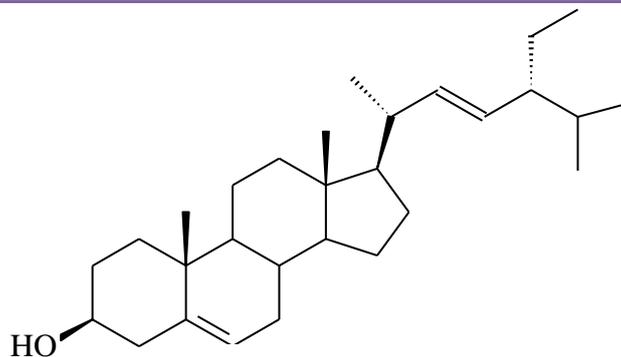
### **Estudo da fração 15-16**

As frações 15 e 16 foram unidas para aumentar a massa e seguir a purificação. Foram purificadas em CLAE com coluna semipreparativa e AcOEt/Hx a 60% como eluente, obtendo-se 19,8 mg de P15. O espectro de RMN<sup>1</sup>H do produto encontra-se na página 159.

Os produtos que foram possíveis de seguir com análise espectroscópica e identificação, graças ao seu grau de pureza e quantidade, foram P13 e P15, nomeados ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico, respectivamente.

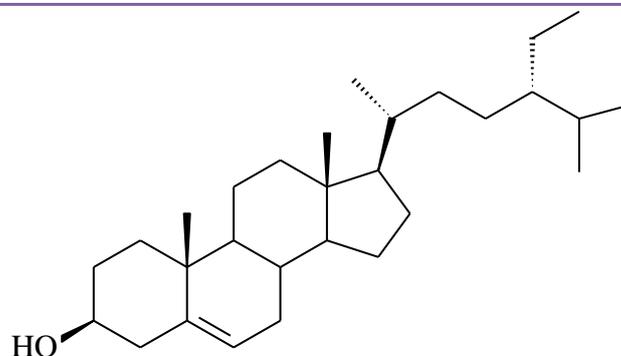
Na Figura 13.3, e os produtos identificados em folhas jovens de lobeira são agrupados por seu grupo funcional e assim discutidos.

## Triterpenos e Esteróides

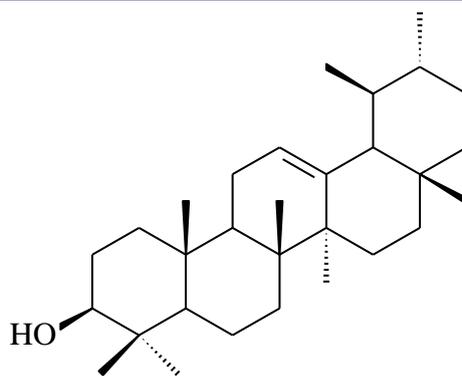


estigmasterol (1)

P8

 $\beta$ -sitosterol (2)

P9

 $\alpha$ -amirina (3)

P7

Figura 13.3. Produtos isolados do extrato de diclorometano de folhas jovens de lobeira.

Os esteróides são componentes comuns nos vegetais. Esses compostos estão envolvidos no crescimento do tubo polínico, na elongação do entrenó, enrolamento de folhas de gramíneas e são considerados reguladores de crescimento (Buchanan *et al.* 2000). Também se pode ressaltar a grande aplicação dessa família de compostos na medicina.

É possível destacar a capacidade dos fitoesteróides para controlar os níveis de colesterol no sangue de pacientes com hipercolesterolemia (Awad *et al.* 2003). Devido à similaridade desses compostos, os fitoesteróides atuam inibindo a absorção do colesterol (Berger *et al.* 2004). Além disso, possuem atividade anticancerígena, destacando sua implicação no câncer de mama (Awad *et al.* 2000), onde os fitoesteróides retardam o desenvolvimento de células cancerígenas. Também possuem atividade antiarteriosclerose (Moghadasian *et al.* 1997), antiinflamatória (Bouic 2001) e antioxidante (Homma *et al.* 2003).

Alguns esteróides foram isolados de cereais com atividade alelopática, como em cevada (*Hordeum vulgare*) (Everall & Lees 1996), trigo (*Triticum aestivum*) (Tanaka *et al.* 1990), *Chamaccyparis obtusa* e *Cryptomeria japonica* (Ishii & Kadoya 1993) e feijão-frade (*Vigna unguiculata*) (Kpoviéssi *et al.* 2008).

Do extrato de diclorometano de folhas de arroz também foi possível isolar o estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol e sua atividade alelopática (juntamente com outros 5 esteróides) foi testada em crescimento da erva invasora *Echinochloa crus galli* (Macias *et al.* 2006b). A atividade inibitória desses dois compostos foi considerada baixa se comparada com outros esteróides como o 7-oxo-estigmasterol. Isso mostra o papel da estrutura do composto e sua atividade. Esteróides que apresentavam dupla ligação na cadeia lateral, por exemplo, apresentavam uma atividade fitotóxica maior para a espécie estudada. Nesse contexto, modificações estruturais provocam aumento da fitotoxicidade, principalmente pela modulação lipofílica, ou seja, modificações estruturais que permitam uma maior absorção pela célula e, conseqüentemente, um melhor resultado no seu sítio ativo dentro da célula (Macías *et al.* 2008).

Em plantas do gênero *Solanum*, é possível isolar muitos esteróides, inclusive os esteróides glicosilados (Zhu *et al.* 2001). Vieira (1993) fez um levantamento

bibliográfico até aquela época referente à produção de alcalóides esteroidais dentro do gênero *Solanum* e dos 196 táxons analisados houve uma predominância de solasonina (63,4%), solamargina (66,7%) e solanigrina (22,2%), mostrando alguns exemplos de compostos dessa natureza que predominam dentro de gênero *Solanum*.

Os esteróides glicosilados são conhecidos por interferir no crescimento e desenvolvimento de outras plantas, como descrito para *S. crinitum*, *S. aruno* e *S. lyratum* (Alves *et al.* 2003; Fukuhara *et al.* 2004). Além dessa classe de esteróides, saponinas esteroidais também são comuns e possuem atividade alelopática (Zhou *et al.* 2006a). Um dos esteróides com interesse comercial presente em abundância nesse gênero é a Solasodina, usada como fonte na produção de progesterona e cortisona. As espécies presentes no DF, bem como a lobeira, já foram avaliadas quanto à quantidade desse composto, mostrando serem espécies promissoras para sua produção (Mola *et al.* 1997).

O fruto de lobeira apresenta várias atividades medicinais, tais como agente hipoglicêmico e hipocolesterolemia, bem como para controle de obesidade e inibição da atividade gástrica (Vieira *et al.* 2003; Dall'Agnol & Lino Von Poser 2000; Perez *et al.* 2006; Yoshikawa *et al.* 2007). Do extrato metanólico do fruto de lobeira foram extraídos e identificados 5 saponinas esteroidais, dentre elas solasonina, somargina e outros (Nakamura *et al.* 2008). No estudo fitoquímico das folhas dessa espécie, não há trabalhos relatando os produtos presentes, sendo os dados mostrados aqui inéditos para essa parte da planta. Uma vez que o foco desse trabalho é a fitotoxicidade dos compostos, trabalhar com os produtos presentes na folha apresenta uma maior representatividade do que pode acontecer em situação de campo, uma vez que esses produtos serão disponibilizados no ambiente através da lixiviação e/ou decomposição das folhas de lobeira no seu ambiente natural.

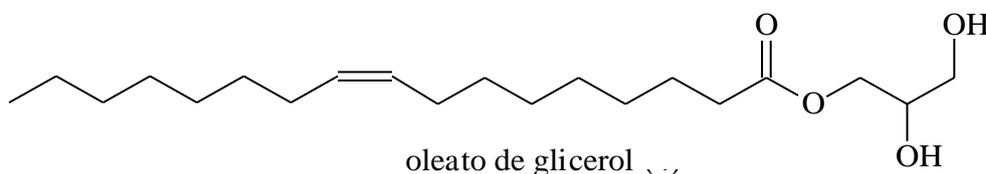
Os terpenos, ou terpenóides, constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir da acetil CoA ou intermediários glicolíticos. São conhecidos por serem ótimos repelentes de herbívoros (Taiz & Zeiger 2004). Muitos terpenos são conhecidos por apresentarem atividade fitotóxica e alelopática (Macías *et al.* 1997; Cutillo, *et al.* 2006) e os óleos essenciais têm tido um papel importante na fitotoxicidade em plantas (Dudai *et al.* 1999; Alves, *et al.* 2004, Angelini, *et al.* 2003). Os mecanismos de ação dos

triterpenos é desconhecido. Duke & Oliva (2004) mencionam que a atividade fitotóxica pode estar ligada à inibição de algum estágio da mitose e à redução do acúmulo de clorofila.

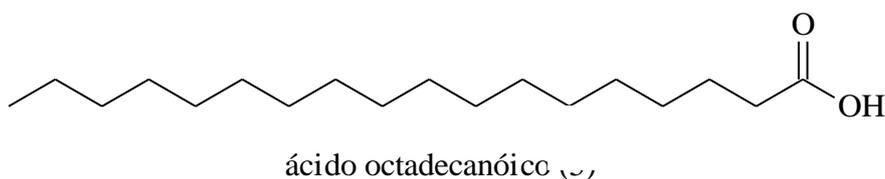
Zinov`Eva *et al.* (2001) mencionam o envolvimento dos triterpenos na adaptação de plantas ao estresse induzido por nematóides parasitas e na propriedade inseticida da árvore de Nim (*Azadirachta indica* L. Meliaceae). Em ambiente marinho, os triterpenos glicosilados produzidos por esponjas apresentam importante papel ecológico, evitando a predação, o ataque de bactérias e o crescimento de outras esponjas (Kubaneck *et al.* 2002). Tang *et al.* (1995) também relatam a produção de 20 terpenos de *Picea abies* em situação de estresse hídrico, tanto de seca quanto de inundação. Em situação de seca, todos os terpenos analisados aumentaram sua produção significativamente em relação ao controle, mostrando o papel desses compostos na proteção da planta contra estresse hídrico. Esse composto em lobeira poderia não somente ter um papel fitotóxico como também proteger essa espécie contra herbívoros e adaptá-la às condições ambientais desfavoráveis onde essa planta vive, ou seja, com múltiplas funções. Na há relato de  $\alpha$ -amirina em lobeira, sendo esse trabalho o primeiro registro desse composto no estudo fitoquímico dessa espécie.

Na Figura 14.3 encontram-se os outros produtos isolados da folha de lobeira.

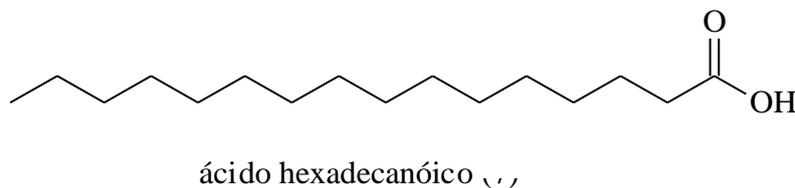
### Ácidos Graxos



P11



P13



P15

Figura 14.3. Produtos isolados do extrato de acetona (P11 e P15) e do extrato de diclorometano (P13) de folhas jovens de lobeira.

Os ácidos graxos e seus derivados estão entre os lipídeos mais comuns nas plantas. Os ácidos graxos são derivados da via Acetil-CoA (Taiz & Zeiger 2004). Esses ácidos graxos são importantes fontes de energia de reserva em plantas e animais. São também parte importante da estrutura da membrana vegetal como os fosfolipídeos e galactolipídeos (Buchanan *et al.* 2000). Os ácidos graxos também podem ser convertidos pela planta em muitos outros compostos bioativos. Um desses compostos

importantes é o ácido jasmônico que está envolvido na regulação do desenvolvimento vegetal, como mensageiro secundário dentro da célula, importante sinalizador entre plantas e entre plantas e insetos (Parchman *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 2001).

Uma análise dos óleos presentes em folhas de seis espécies do gênero *Stachys* mostrou forte potencial antioxidante e citotóxico contra células tumorais humana (Conforti *et al.* 2009).

Existem formas de ácidos graxos livres que são tóxicas para células vegetais e de fungos (Seigler 2006). O acetato e propionato são conhecidos por apresentarem um potencial efeito antifúngico (Seigler 2006). Ácidos graxos e óleos essenciais isolados da parte aérea de duas espécies do gênero *Achillea* (Asteraceae) foram tóxicos para mais de 12 tipos de fungos fitopatogênicos e também inibiram a germinação e crescimento de mais outras cinco espécies, mostrando ser produtos com potencial herbicida bem como fungicida (Kordali *et al.* 2009), fato também ocorrido para esses produtos isolados de uma variedade de arroz alelopático (Kong *et al.* 2004).

A atividade herbicida dos ácidos graxos é conhecida há muito tempo, conforme relatado na revisão de Dayan *et al.* (2009), e alguns agem através de uma mistura de compostos, comportando-se como herbicidas não seletivos. Essa mistura age rapidamente e possui amplo espectro no controle de plantas invasoras. Em muitos casos, essa mistura pode ser usada como dessecante. Ácidos graxos com calda alifática como ácido pelargônico (C9) e cáprico (C8, ácido octanóico) são os mais efetivos (Coleman & Penner 2006). O ácido pelargônico é adicionado a herbicidas comerciais para controle de plantas invasoras anuais e musgos (Fausey 2003). Esses causam distúrbios na membrana celular, com rápida perda nas funções celulares (Lederer *et al.* 2004). É considerado um herbicida de baixa toxicidade e baixo impacto ambiental e sem atividade residual (Dayan *et al.* 2009).

Salcedo (2007) testou a atividade fitotóxica de ésteres dos ácidos octadecanóico e hexadecanóico e desses dois o primeiro apresentou maiores valores inibitórios sobre o crescimento da raiz e da parte aérea de *Echinochloa crus-galli*, principal planta daninha de plantações de arroz.

Através das evidências do efeito fitotóxico de ésteres de ácidos graxos, dá indícios de que a atividade inibitória dos extratos analisados seja pela presença desses

compostos. Além do que os mesmos podem conferir uma vantagem adaptativa à lobeira, não somente pela atividade herbicida, mas também pela atividade antifúngica e antioxidante já descritas para outras espécies.

## CONCLUSÕES

1. Os maiores rendimentos nas extrações foram dos extratos de maior polaridade, como o aquoso e o metanólico;
2. No bioensaio com coleóptilo estiolado de trigo, as frações líquido-líquido foram as que demonstraram maior atividade inibitória;
3. O efeito fitotóxico dos extratos e frações foi maior no crescimento da parte aérea e radicular das espécies alvo do que na germinação das sementes;
4. A espécie-alvo mais sensível à ação dos compostos fitotóxicos foi o tomate e as menos sensíveis, a cebola e alface;
5. O extrato mais ativo foi o de acetona e as frações líquido-líquido diclorometano e acetato de etila demonstraram maior efeito fitotóxico;
6. Os compostos isolados do extrato de diclorometano e acetona foram 2 esteróides (estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol), 1 triterpeno ( $\alpha$ -amirina) e 2 ácidos graxos (ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico) e 1 éster de ácido graxo (oleato de glicerol) totalizando 6 produtos identificados dos extratos mais ativos de folhas jovens de lobeira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelgaleil, S., & Hashinaga, F. (2007). Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (11):737-742.
- Adkins, S., Ashmore, S., & Navie, S. (2007). *Seeds: biology, development and ecology*. Cambridge: CAB International.
- Aires, S. S., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2005). Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. *Acta Botanica Brasilica*, 19 (2): 339-344.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J., & Mason, T. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistr*, 11:261-265.

- Alías, J., Sosa, T., Escudero, J., & Chaves, N. (2006). Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. *Plant and Soil*, 282: 327-332.
- Aliero, A., Asekun, O., Grierson, D., & Afolayan, A. (2006). Chemical composition of the hexane extract from the leaves of *Solanum pseudocapsicum*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(6): 1054-1056.
- Aliotta, G., Cafiero, G., & Otero, A. (2006). Weed germination, seedling growth and their lesson for allelopathy in agriculture. In M. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (pp. 285-297). Springer.
- Alves, C. C., Alves, J. M., Silva, T. M., Carvalho, M. G., & Neto, J. J. (2003). Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. *Floresta e Ambiente*, 10(1): 93-97.
- Alves, M. d., Filho, S. M., Innecco, R., & Torres, S. B. (2004). Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(11):1083-1086.
- Angelinin, L., Carpanese, G., Cioni, P., Morelli, I., Macchia, M., & Flamini, G. (2003). Essential oil from mediterranean lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51: 6158-6164.
- Assiff, S. &. (2003). Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) fleming. *Journal Asian Natural Products. Research*, 5:35-41.
- Awad, A., Downie, A., Fink, C., & Kim, U. (2000). Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Research*, 20:821-824.
- Awad, A., Roy, R., & Fink, C. (2003). Beta-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 10:497-500.
- Belz, R. G., & Hurle, K. (2004). A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (1): 175-198.
- Berger, A., Peter, J., & Abumweis, S. (2004). Plants sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3: 5.
- Bouic, P. (2001). The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Current Opinion Clinical Nutrition. Metabolic Care*, 4:471-475.

- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- Chen, L., Wang, S., & Yu, X. (2005). Effects of phenolics on seedling growth and N-15 nitrate absorption of *Cunninghamia lanceolata*. *Allelopathy Journal*, 15, pp. 57-65.
- Chou, C. H. (1999). Role of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Review in Plant Sciences*, 18:609-636.
- Chou, C., & Chou, S. (1979). Autointoxication mechanism of *Oryza sativa*. II. Effects of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on rice productivity. *Journal of Chemical Ecology*, 5:839-859.
- Coleman, R., & Penner, D. (2006). Desiccant activity of short chain fatty acids. *Weed Technology*, 20(10): 410-415.
- Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N., et al. (2009). Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*, 116: 898-905.
- Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., & Zarrelli, A. (2006). Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry*, 67:481-485.
- Cutler, H. (1985). *Bioregulators for Pest Control*. (P. Hedin, Ed.) Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Dall'Agno, R., & Poser, G. (2000). The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 337-341.
- Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2006). Clues in the search for new herbicides. In M. J. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, *Allelopathy: A physiological process with ecological implications* (pp. 63-83). Springer.
- Dayan, F., Cantrell, C., & Duke, S. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:4022-4034.
- Della, G., & Monaco, P. P. (1990). Stigmasterols from *Typha latifolia*. *Journal of Natural Product*, 53:1430-1435.
- Dias, L., & Dias, A. (2007). Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. *Revista de Ciências Agrárias*, 30(1):510-517.
- Dudai, N., Poljakoff-mayber, A., Mayer, A., Putievsky, E., & Lerner, H. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25(5):1079-1089.

- Duke, S., & Oliva, A. (2004). Mode of action of phytotoxic terpenoids. In J. J. F.A.Macías, *Allelopathy: chemistry, and mode of action of allelochemicals* (pp. 201-216). Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Duke, S., Dayan, R., Romagni, J., & Rimando, A. (2000). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, 40, pp. 99-111.
- El-Khatib, A., Hegazy, A., & Galal, H. (2004). Allelopathy in the rhizosphere and amended soil of *Chenopodium murale* L. *Weed Biology and Management*, 4, pp. 35-42.
- Ercoli, L., Masoni, A., Pampana, S., & Arduini, I. (2007). Allelopathic effects of rye, brown mustard and hairy vetch on redroot pigweed common jabsquarter and knotweed. *Allelopathy Journal*, 19 (1), 249-256.
- Ervin, G., & Wetzel, R. (2000). Allelochemical autotoxicity in the emergent wetland macrophyte *Juncus effuses* (Juncaceae). *American Journal of Botany*, 87: 852-860.
- Everall, N., & Lees, D. (1996). The use of barley-straw to control general and blue-green algal growth in a derbyshire reservoir. *Water Research*, 30: 269-276.
- Fausey, J. (2003). Controlling liverwort and moss now and in the future. *Hort Technology*, 13, pp. 35-38.
- Fenner, M. (2000). *Seeds-The Ecology of regeneration in plant communities*. New York: Cambridge University Press.
- Ferreira, A., & Áquila, M. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12, pp. 175-204.
- França, A. C., Souza, I. F., Santos, C. C., Oliveira, E. Q., & Martinotto, C. (2008). Atividade alelopática de nim sobre o crescimento do sorgo, alface e picão-preto. *Ciência Agrotecnica*, 32(5):1374-1379.
- Friedman, J., & Waller, G. (1983). Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee *Coffea arabica* L. *Journal of Chemical Ecology*, 9:1099-1106.
- Fukuhara, K., Shimizu, K., & Kubo, I. (2004). Arudonine, and allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. *Phytochemistry*, 65:1283-1286.
- Gatti, A. B., Perez, S. C., & Lima, M. I. (2004). Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, 18(3): 459-472.
- Gracian-Tous, J., & Martel, J. (1969). Composition of the sterol fraction of vegetable fats, as determined by gas chromatography. *Grasas y Aceites*, 20: 231-234.

- Hasegawa, K., Mizutani, J., Kosemura, S., & Yamamura, S. (1992). Isolation and identification of Lepidimoide, a new allelopathic substance from mucilage of germinated cress seeds. *Plant Physiological*, 100:1059-1061.
- Hedge, R., & Miller, D. (1990). Allelopathy and autotoxicity in alfafa: characterization and effects of preceding crops and residue incorporation. *Crop Science*, 30: 1255-1259.
- Hierro, J. L., & Callaway, R. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, 256:29-39.
- Homma, Y., Ikeda, I., Ishikawa, T., Tateno, M., Sugano, M., & Nakamura, H. (2003). A randomized, placebo-controlled trial: decrease in plasma low-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, cholesteryl ester transfer protein, and oxidized low-density lipoprotein by plant stanol ester-containing spread. *Nutrition*, 19: 369-374.
- IAS. (1996, September). International Allelopathy Society Constitution. *First World Congress on Allelopathy. A Science for the Future*.
- Inderjit. (1995). On laboratory bioassay. *Botanical Review*, 61:28-34.
- Inderjit, & Duke, S. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217:529-539.
- Inderjit, & Nielsen, E. (2003). Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3-4):221-238.
- Ishii, T., & Kadoya, K. (1993). Phytotoxic constituents in the bark and sawdust extracts of *Chamaecyparis obtusa* and *Cryptomeria japonica* and their effects on the growth of seedlings of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* Raf.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Japan. Societ. Horticultural Science*, 62: 285-294.
- Kato-Noguchi, H., Ino, T., Sata, N., & Yamamura, S. (2002). Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiologia Plantarum*, 115(3): 401-405.
- Kong, C., Xu, X., Zhou, B., Hu, F., Zhang, C., & Zhang, M. (2004). Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weed and fungal pathogens. *Phytochemistry*, 65:1123-1128.
- Kordali, S., Cakir, A., Akcin, T., Mete, E., Akcin, A., Aydin, T., et al. (2009). Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Industrial Crop and Products*, 29:562-570.
- Kpoviéssi, D., Gbaguidi, F., Gbéneou, J., Accrombessi, G., Moudachirou, M. R., Hubert, P., et al. (2008). Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Ness) T. Anders by capillary gas

- chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48:1127-1135.
- Kubaneck, J., Whalen, K., Engel, S., Kelly, S., Henkel, T., Fenical, W., et al. (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two *Caribbean spongens*. *Oecologia*, 131:125-136.
- Leather, G., & Einhellig, F. (1986). A bioassay in the study of allelopathy. In A. Putman, & C. Tang, *The Science of Allelopathy*. New York, USA: Wiley-Interscience.
- Lederer, B., Fujimori, T., Tsujino, Y., Wakabayashi, K., & Boger, P. (2004). Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80(3):151-156.
- Lombardi, J., & Motta Jr., J. (1993). Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). *Ciência e Cultura*, 45: 126-127.
- Macías, F.A., Simonet, A., & Galindo, J. (1997). Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *Journal of Chemical Ecology*, 23 (7):1781-1803.
- Macías, F.A., Galindo, J., Castellano, D., & Velasco, R. (2000a). Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 5288-5296.
- Macías, F.A., Castellano, D., & Molinillo, J. M. (2000b). Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48:2512-2521.
- Macías, F.A., Velasco, R., Castellano, D., & Galindo, J. (2005). Application of Hansch's model to guaianolide ester derivatives: a quantitative structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53:3530-3539.
- Macías, F.A., Chinchilla, N., Varela, R., & Molinillo, J. (2006a). Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. *Steroids*, 71:603-608.
- Macías, F.A., Fernández, A., Varela, R., Molinillo, J., & Torres, A. &. (2006b). Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. *Journal of Natural Products*, 69:795-800.
- Macías, F.A., Bastidas, A., Marín, D., Carrera, C., Chinchilla, N., & Molinillo, J. (2008). Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Review*, 7:179-194.

- Mallik, A. (2002). On the question of paradigm in the science of allelopathy. In M. Reigosa, & N. Pedrol, *Allelopathy: from Molecules to Ecosystems* (pp. 289-297). Enfield: Science Publishers.
- Manoel, D. D., Ferrari, T., & Ferreira, G. (2009). Atividade alelopática de extratos frescos e seco de folhas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.)Coville) e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* link) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de tomate. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1):63-70.
- Maraschin-Silva, F., & Aquila, M. E. (2006). Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 20(1):61-69.
- Moghadasian, M., McManus, B., Pritchard, P., & Frohlich, J. (1997). Tall oil-derived phytosterols reduce atherosclerosis in Apo-E deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17:119-126.
- Mola, J., Araujo, E., & Magalhães, G. (1997). Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. *Química Nova*, 20(5):460-462.
- Nakamura, S., Hongo, M., Sugimoto, S., Matsuda, H., & Yoshikawa, M. (2008). Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, "fruta do lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). *Phytochemistry*, 69:1565-1572.
- Oliveira, S. C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004a). Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botanica Brasilica*, 18(3):401-406.
- Oliveira, S. C., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2004b). Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. *Allelopathy Journal*, 13(2):201-210.
- Olofsdotter, M., & Madsen, B. E. (2000). Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): global implication for weedy rice and weed management. *Annual of Applied Biology*, 137:279-295.
- Oueslati, O., Ben-Hammouda, M., Ghorbal, M., Guezzah, M., & Kremer, R. (2005). Barley autotoxicity as influenced by varietal and seasonal variation. *Journal Agronomy & Crop Science*, 191:249-254.
- Parchman, S., Gundlach, H., & Muller, M. (1997). Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology*, 115:1057-1064.

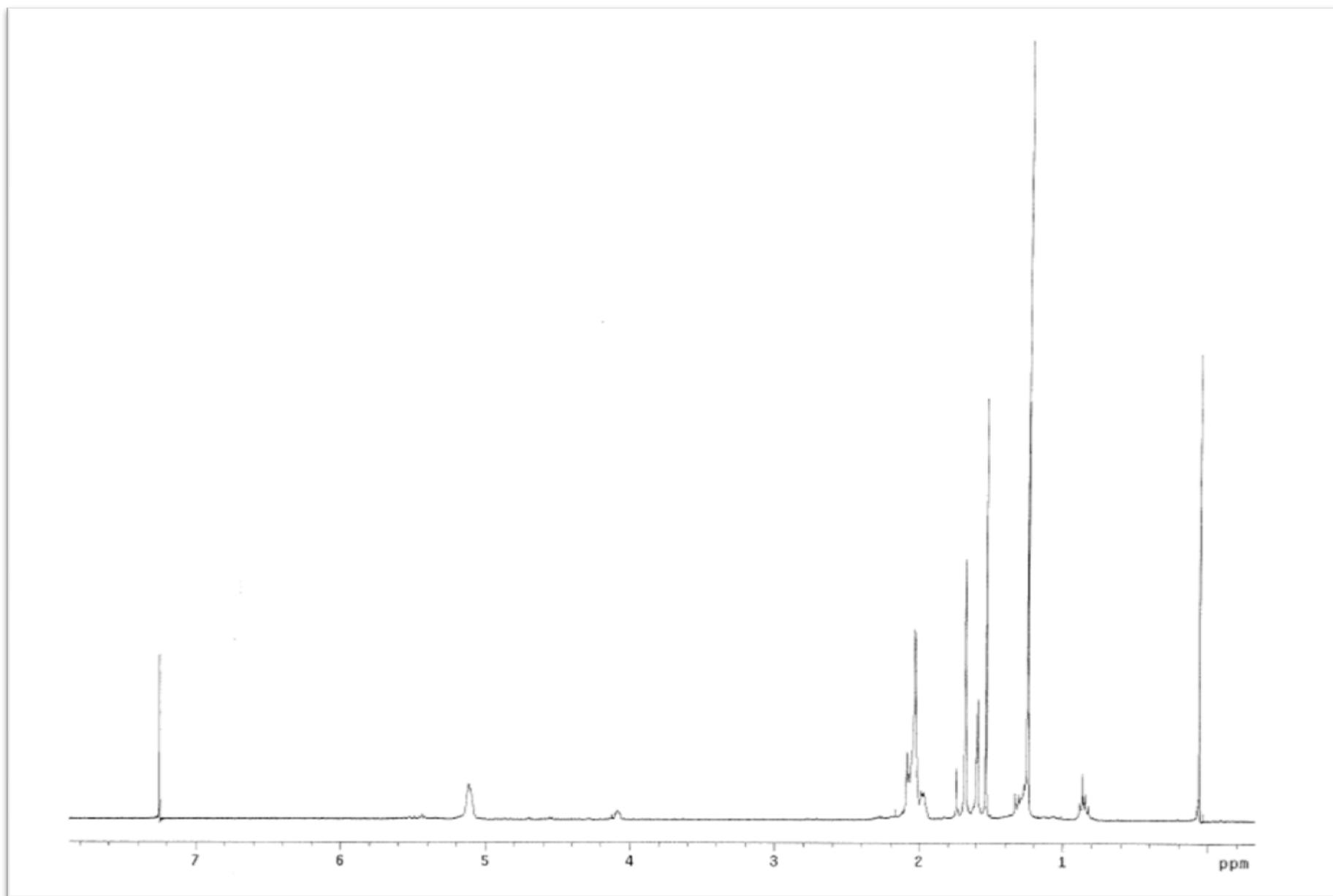
- Parvez, S., Parvez, M., & Fuji, Y. G. (2003). Allelopathy competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. *Plant Growth Regulation*, 41:139-148.
- Parvez, S., Parvez, M., Fujii, Y., & Gemma, H. (2004). Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. *Plant Growth Regulation*, 42:245-252.
- Perez, A., Franca, V., Daldegan Jr., V., & Duarte, I. (2006). Effect of *Solanum lycocarpum* St. Hill on various haematological parameters in diabetic rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 106:442-444.
- Perry, L., Thelen, G., Ridenour, W., Weir, T., & Callaway, R. (2005). Dual role for an allelochemical: (+) catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. *Journal of Ecology*, 93:1126-1135.
- Punjani, B., Patel, K., & Pantel, U. (2006). Allelopathic influence of *Prosopis cineraria* leaf extracts on germination and seedling growth of rice. *Allelopathy Journal*, 18(2):339-344.
- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy* (2a ed.). New York: Academic Press.
- Romagni, J., Duke, S., & Dayan, R. (2000). Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiology*, 123:725-732.
- Romeo, J., & Weidenhamer, J. (1998). Bioassay for allelopathy in terrestrial plants. In K. Haynes, & J. Millar, *Methods in Chemical Ecology*. Norwell MA: Kluwer Academic Publishing.
- Rostagno, M., Palma, M., & Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012:119-128.
- Salcedo, N. (2007). *Estudios alelopáticos de Oryza sativa L.* Puerto Real, Cádiz: Departamentno de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz (Tese doutorado), 461p.
- Sánchez, D. (2002). *Optimización de bioensayos alelopáticos aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales.* Puerto Real, Cádiz: Departamento de química organica, Facultad de ciencias, Universidad de Cádiz (Tese doutorado), 526p.
- Schwarz, A., Pinto, E., Haraguchi, M., Oliveira, C. A., Bernardi, M. M., & Spinosa, H. d. (2007). Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. *Phytotherapy Research*, 21, pp. 1025-1023.
- Seigler, D. (2006). Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. In M. Reigosa, N. Pedrol, & L. Gonzáles, *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (pp. 11-61). Netherlands: Springer.

- Silva, T., Carvalho, M., & Braz-Filho, R. (2003). Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova*, 26(4):517-522.
- Singh, H., & Thapar, R. (2003). Allelopathic influence of *Cannabis sativa* on growth and metabolism of *Parthenium hysterophorus*. *Allelopathy Journal*, 12:61-70.
- Sinkkonen, A. (2007). Modelling the effect of autotoxicity on density-dependent phytotoxicity. *Journal of Theoretical Biology*, 244:218-227.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. Artmed.
- Tanaka, F., Ono, S., & Hayasaka, T. (1990). Identification and evaluation of toxicity of rice root elongation inhibitors in flooded soils with added wheat straw. *Soil Science & Plant Nutrition*, 36:97-103.
- Tang, C., Cai, W., Kohl, K., & Nishimoto, R. (1995). Plant stress and allelopathy. In Inderjit, & F. A. K.M.M. Dakshini, *Allelopathy: organisms, processes, and application* (pp. 143-168). American Chemical Society.
- Vieira, J., Ferreira, P., Matos, L., Ferreira, E., Rodovalho, W., Ferri, P., et al. (2003). Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruit. *Phytotherapy Research*, 17:892-896.
- Vieira, R. C. (1993). Espécies do gênero *Solanum* produtoras de alcalóides esteroidais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 74(4):97-111.
- Wandscheer, A., & Pastorini, L. (2008). Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. *Ciência Rural*, 38(4):949-953.
- Watanabe, T., Seo, S., & Sakai, S. (2001). Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*. *Plant Physiology Biochemistry*, 39:121-127.
- Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., An, M., & Liu, D. (2007). Autotoxicity of wheat (*Triticum aestivum* L.) as determined by laboratory bioassays. *Plant Soil*, 296:85-93.
- Ye, W.-C., Wang, H., Zhao, S.-X., & Che, C.-T. (2001). Steroidal glycoside and glycoalkaloid from *Solanum lyratum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(4):421-423.

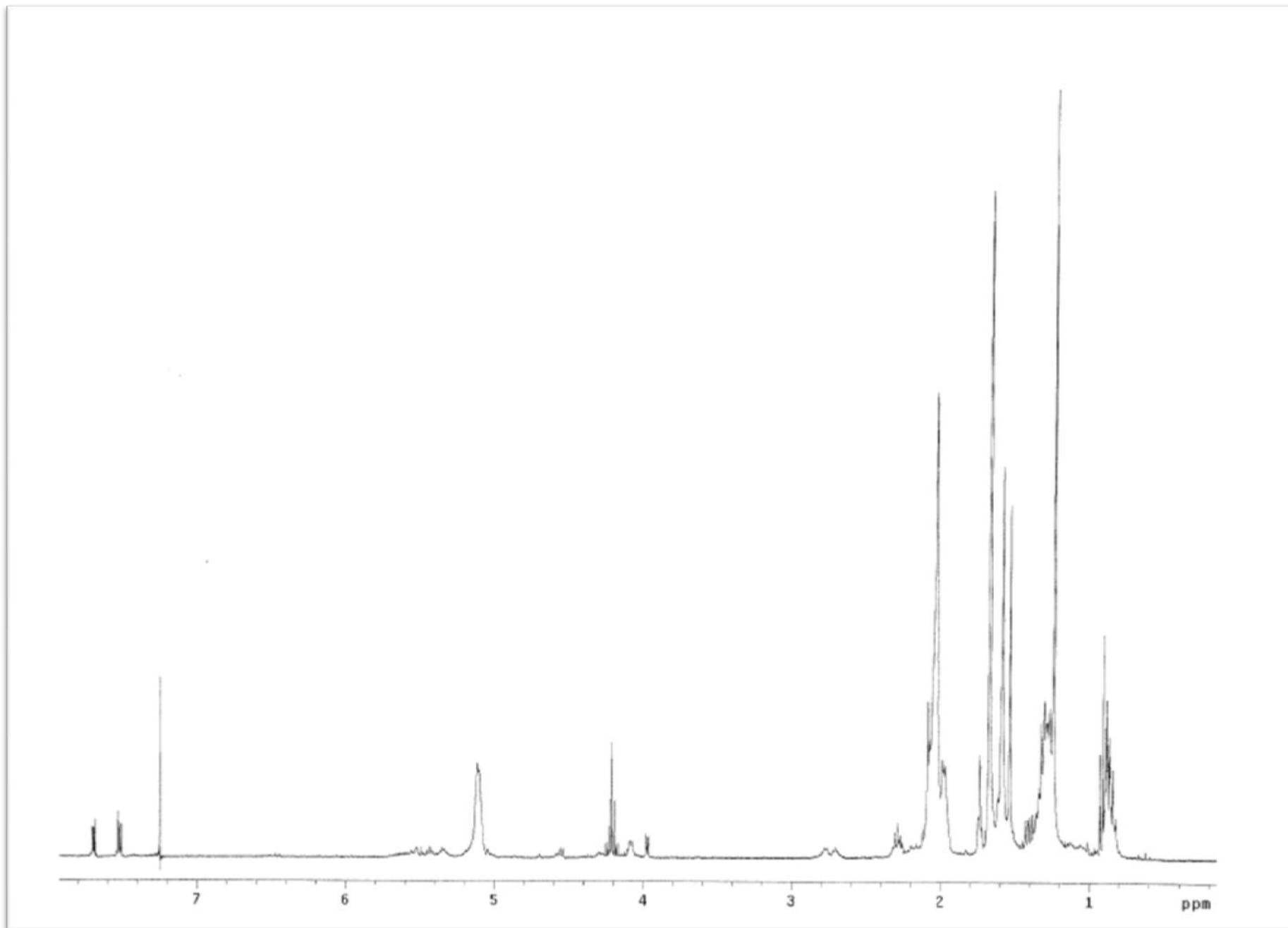
- Yoshikawa, M., Nakamura, S., Ozaki, K., Kumahara, A., Morikawa, T., & Matsuda, H. (2007). Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneoisides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. *Journal of Natural Products*, 70:210-214.
- Young, C., & Thorne, R. W. (1989). Phytotoxic potential of soil and wheat straw in rice rotation cropping systems of subtropical Taiwan. *Plant Soil*, 120: 95-101.
- Zhou, S., He, S., Wang, G., Gao, H., Zhou, G., Ye, W., et al. (2006). Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. *Journal of Natural Products*, 69:158-1163.
- Zhou, Y., & Yu, J. (2006). Allelochemicals and photosynthesis. In M. Reigosa, N. Pedrol, & L. Gonzáles, *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* (pp. 127-139). Netherlands: Springer.
- Zhu, Z., Takagi, M., Ikeda, T., Midzuki, K., & Nohara, T. (2001). Withanolide-type steroids from *Solanum cilistum*. *Phytochemistry*, 56:741-745.
- Zinov`eva, S., Udalova, Z., Vasil`eva, I., Vanyushkin, S., & Paseshnikchenko, V. (2001). Role of isoprenoids in plant adaptation to biogenic stress induced by parasitic nematodes (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37:533-541.

## ANEXO

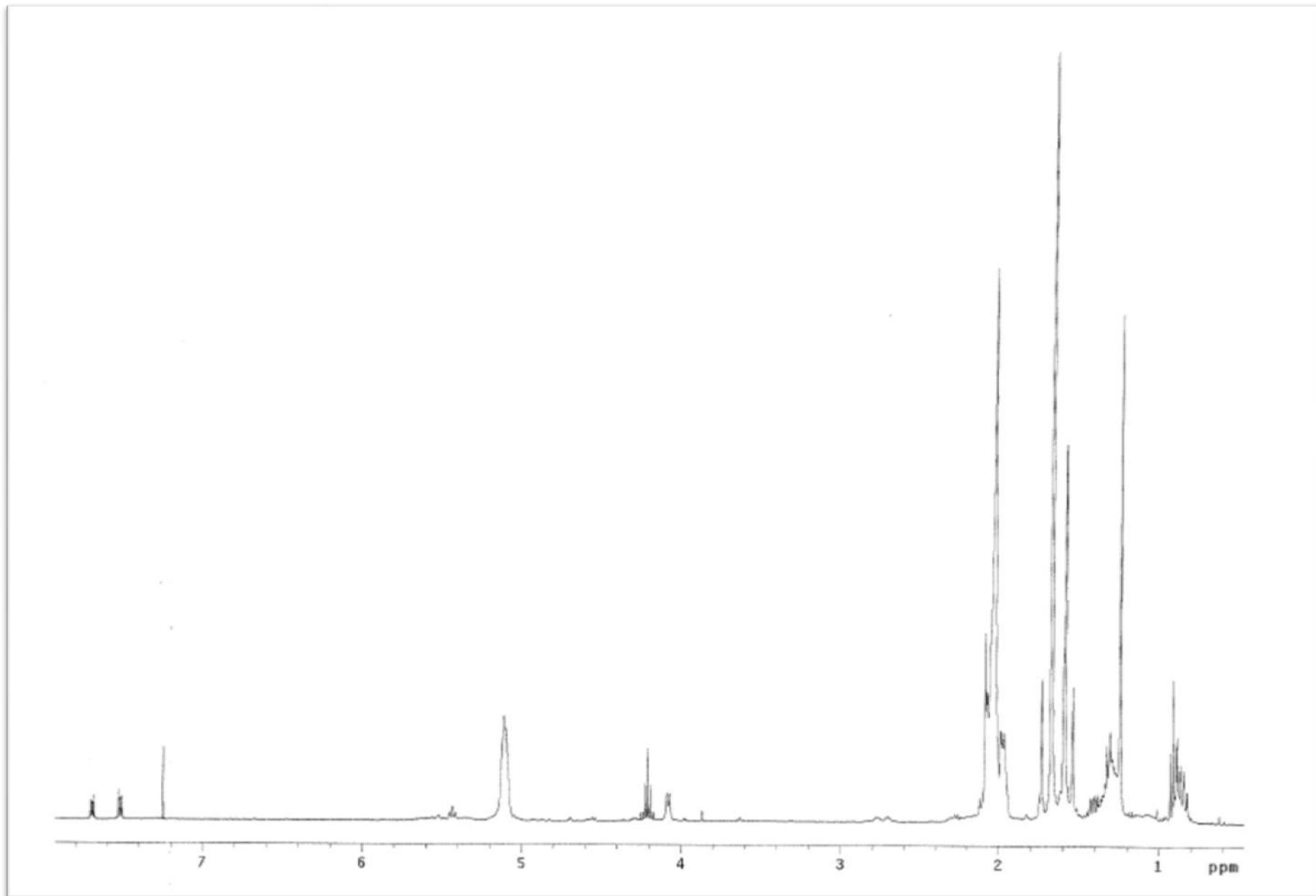
### Espectros de RMN-<sup>1</sup>H



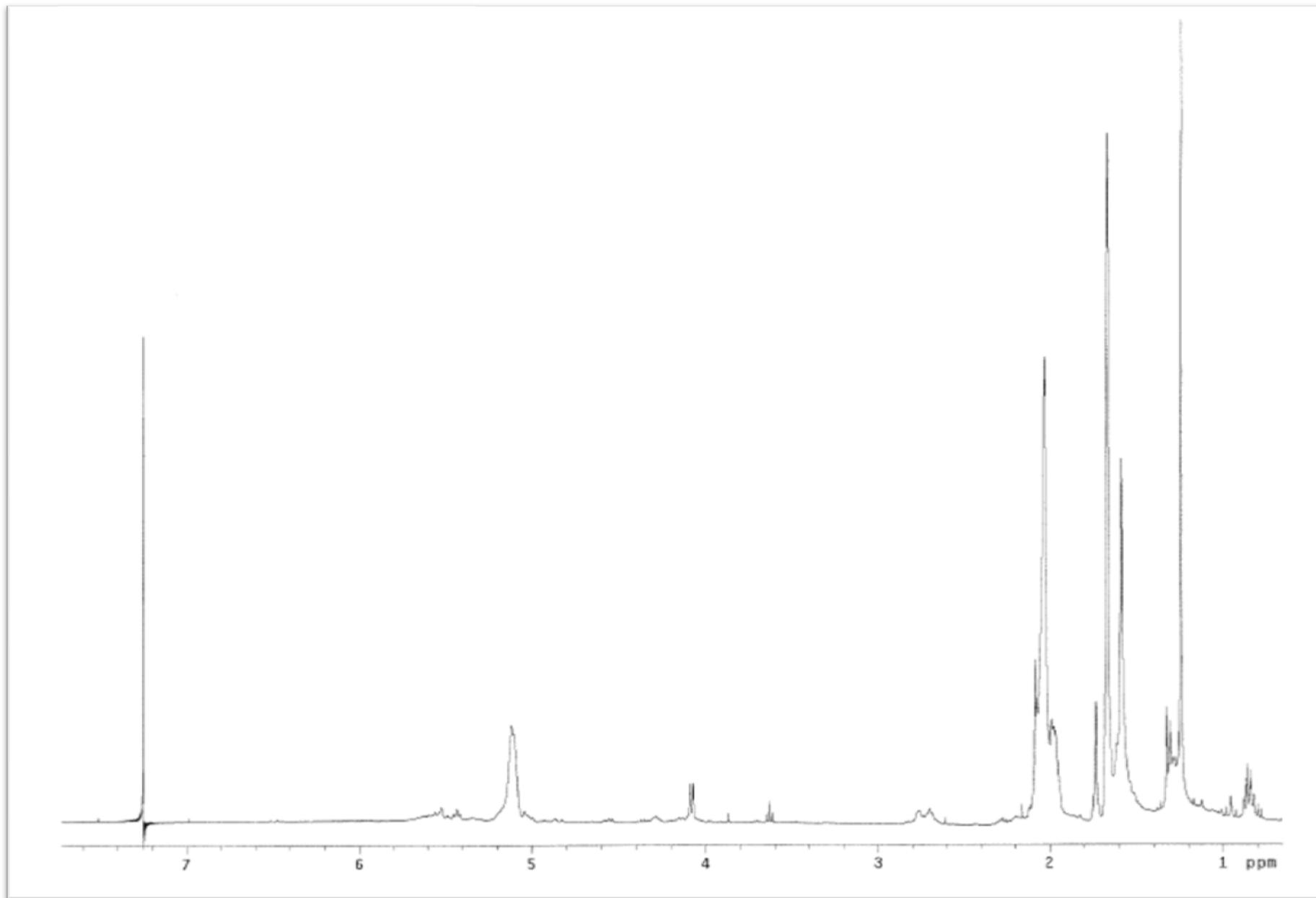
Espectro de RMN $^1\text{H}$  de P1



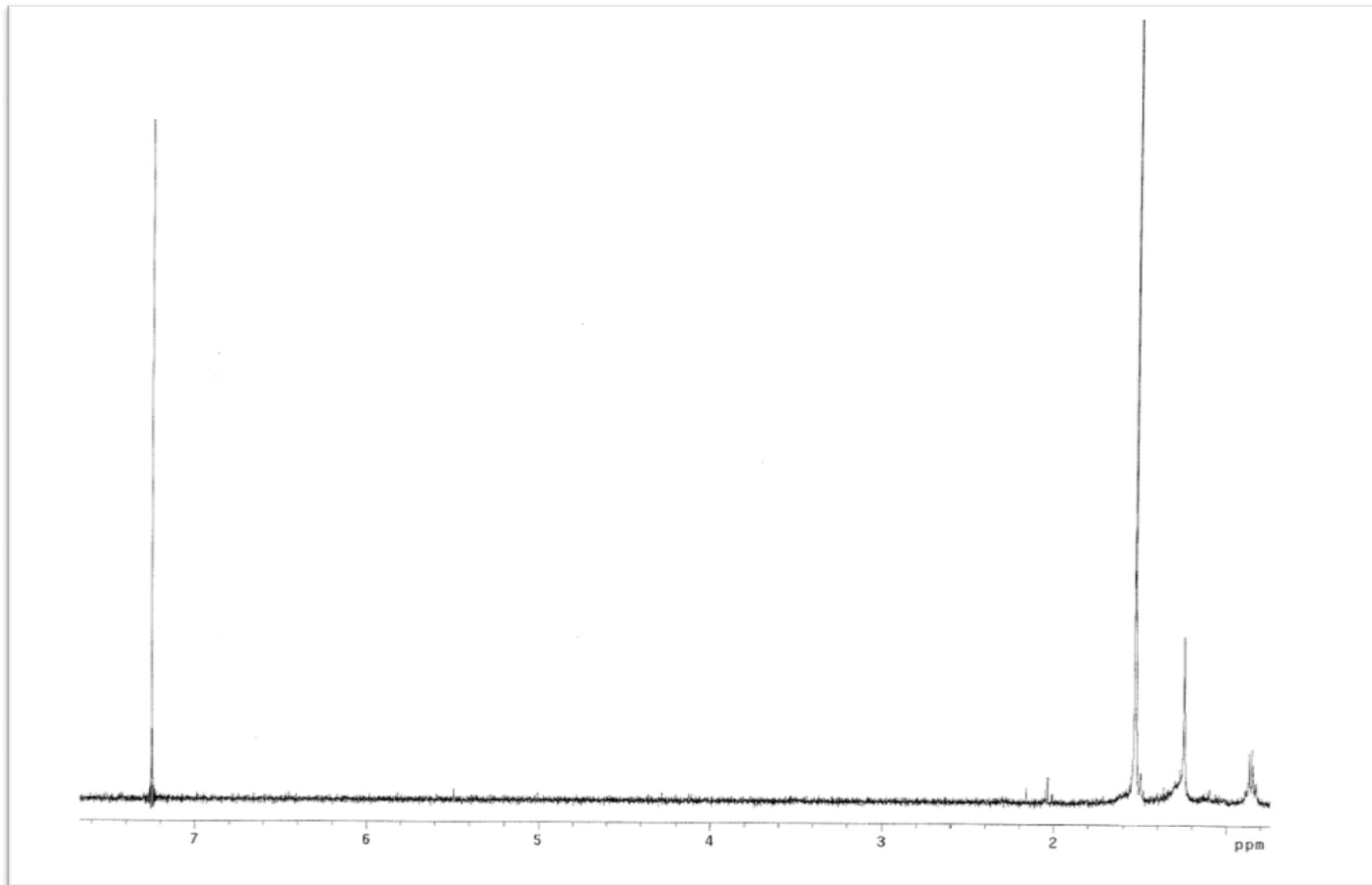
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de P2



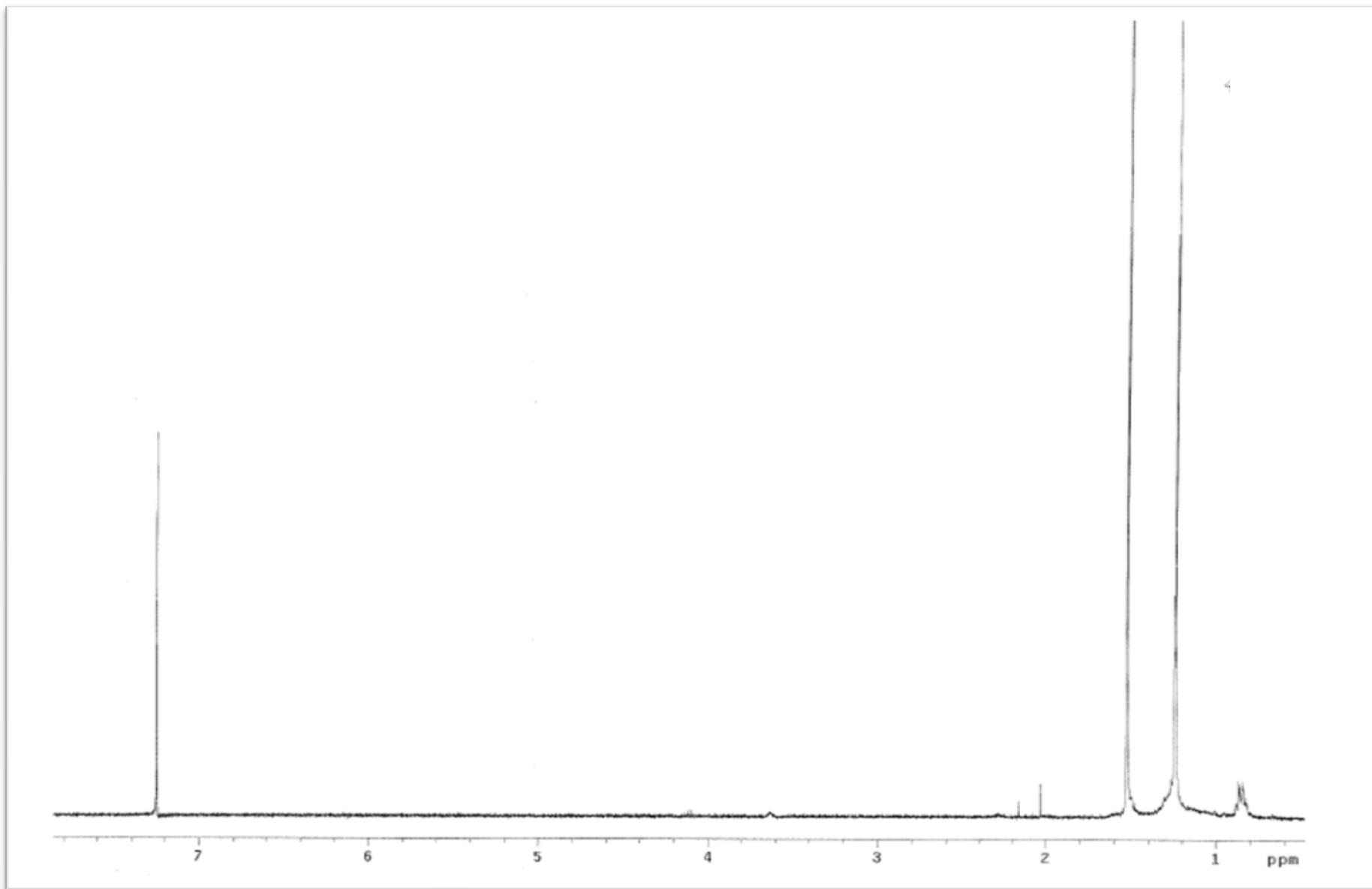
Espectro de RMN $^1\text{H}$  de P3



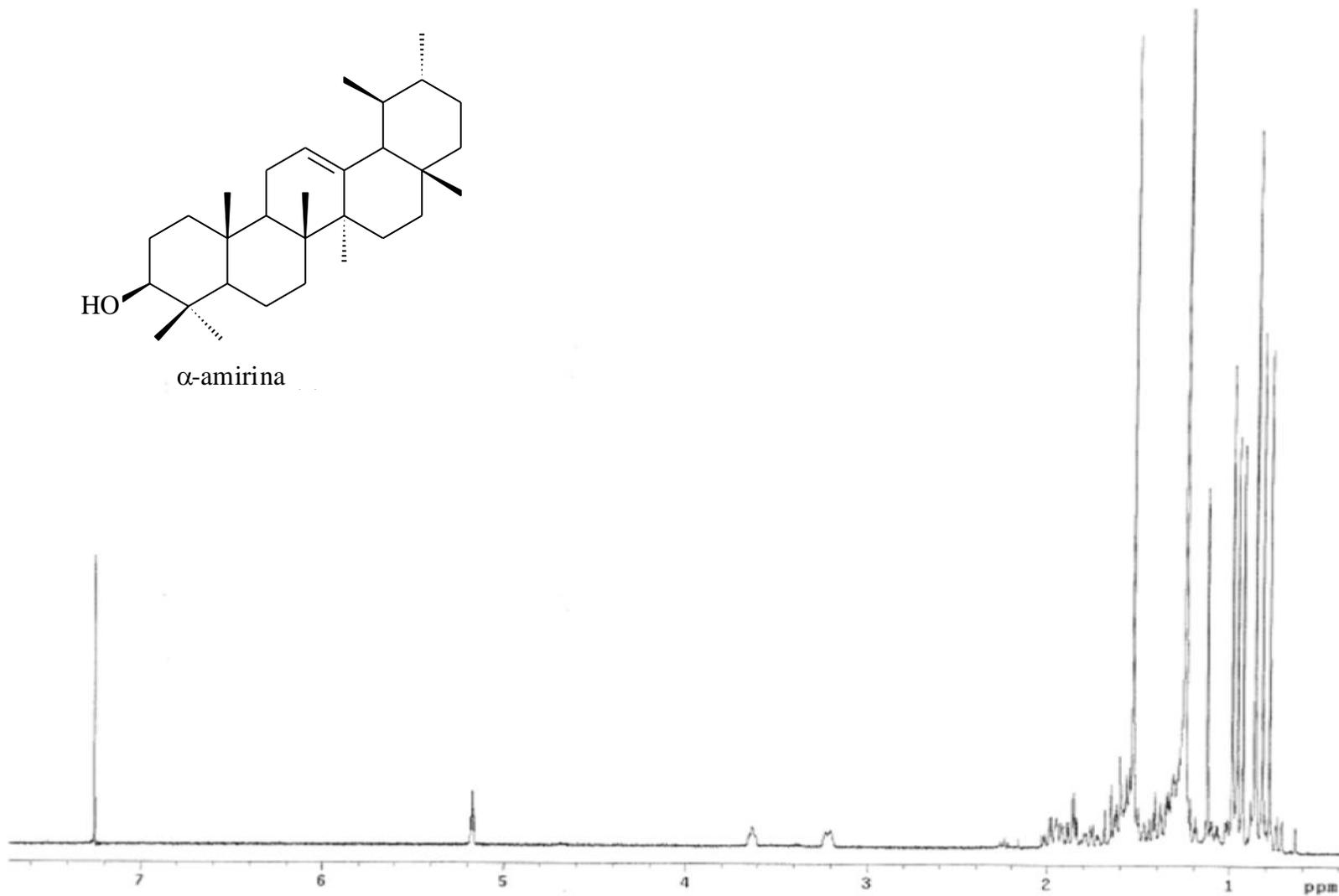
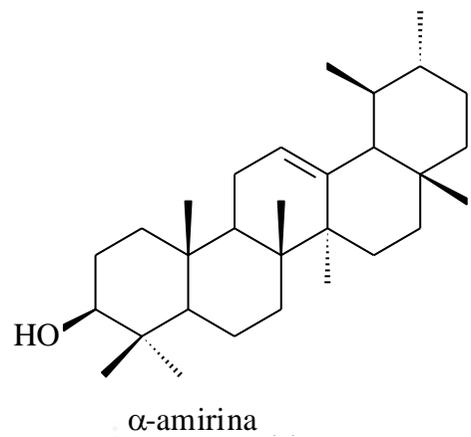
Espectro de RMN $^1\text{H}$  de P4



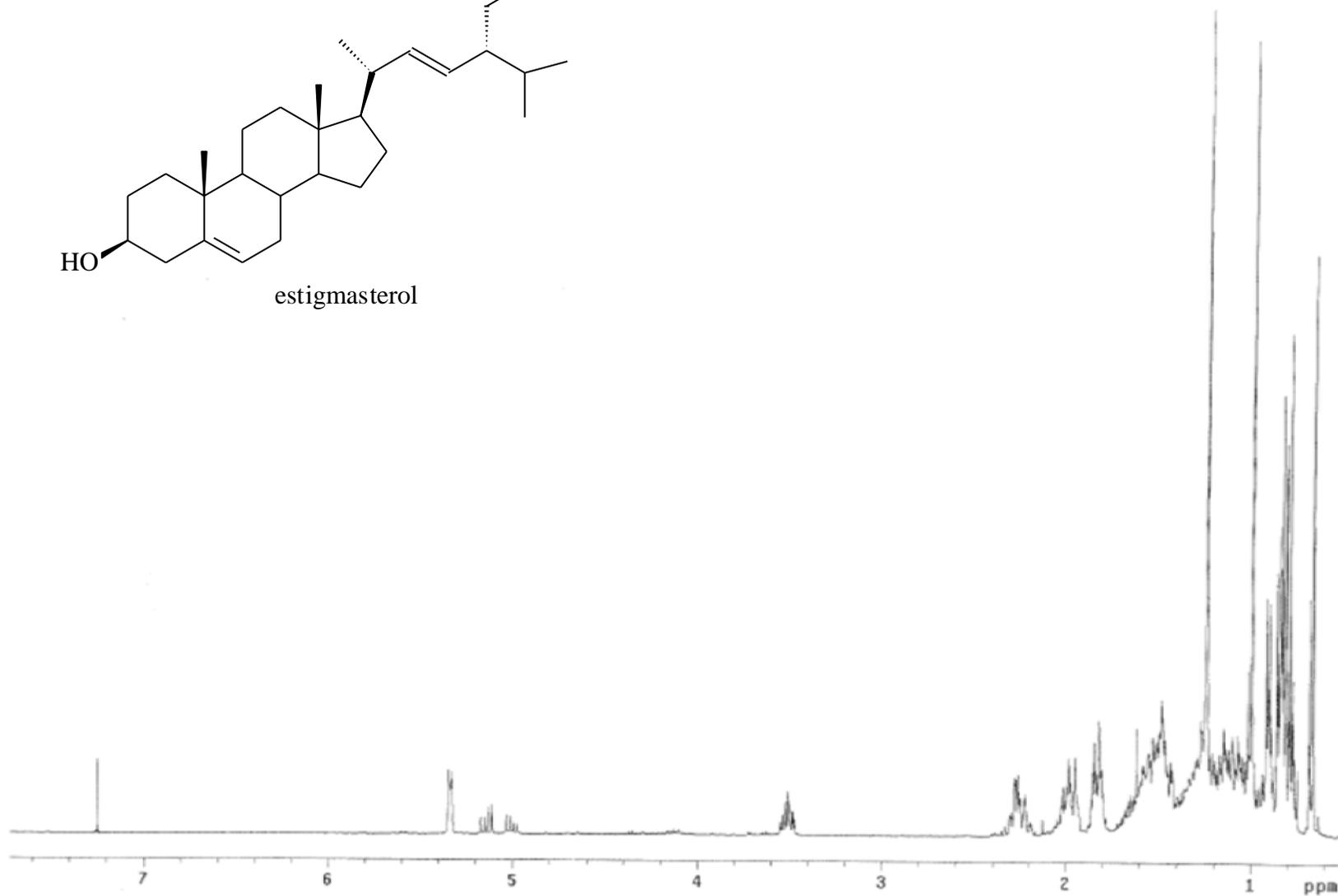
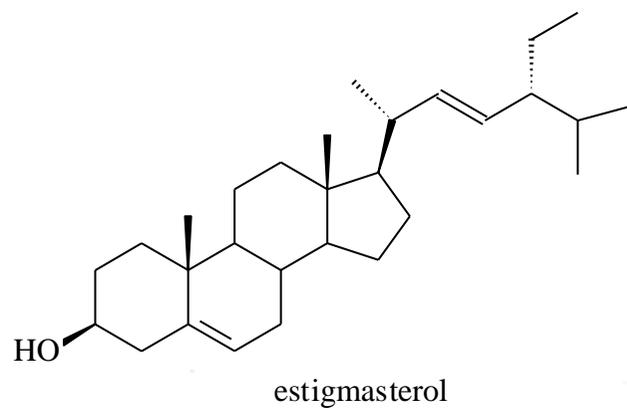
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de P5



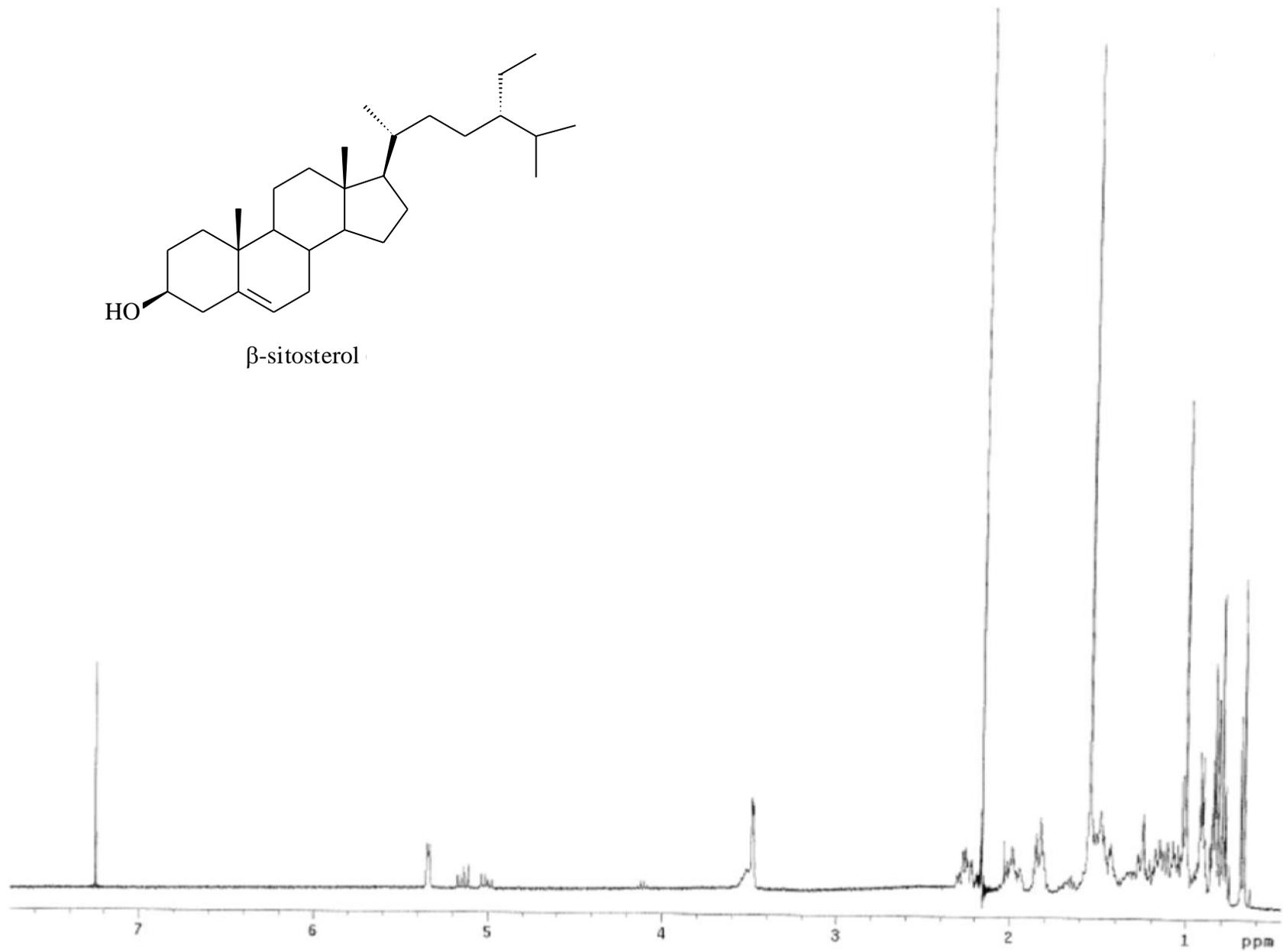
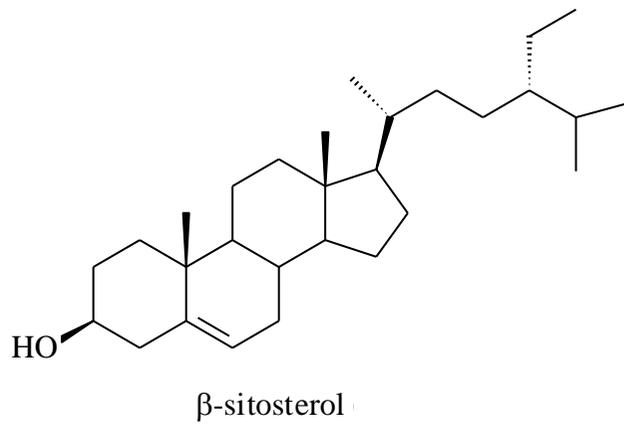
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de P6



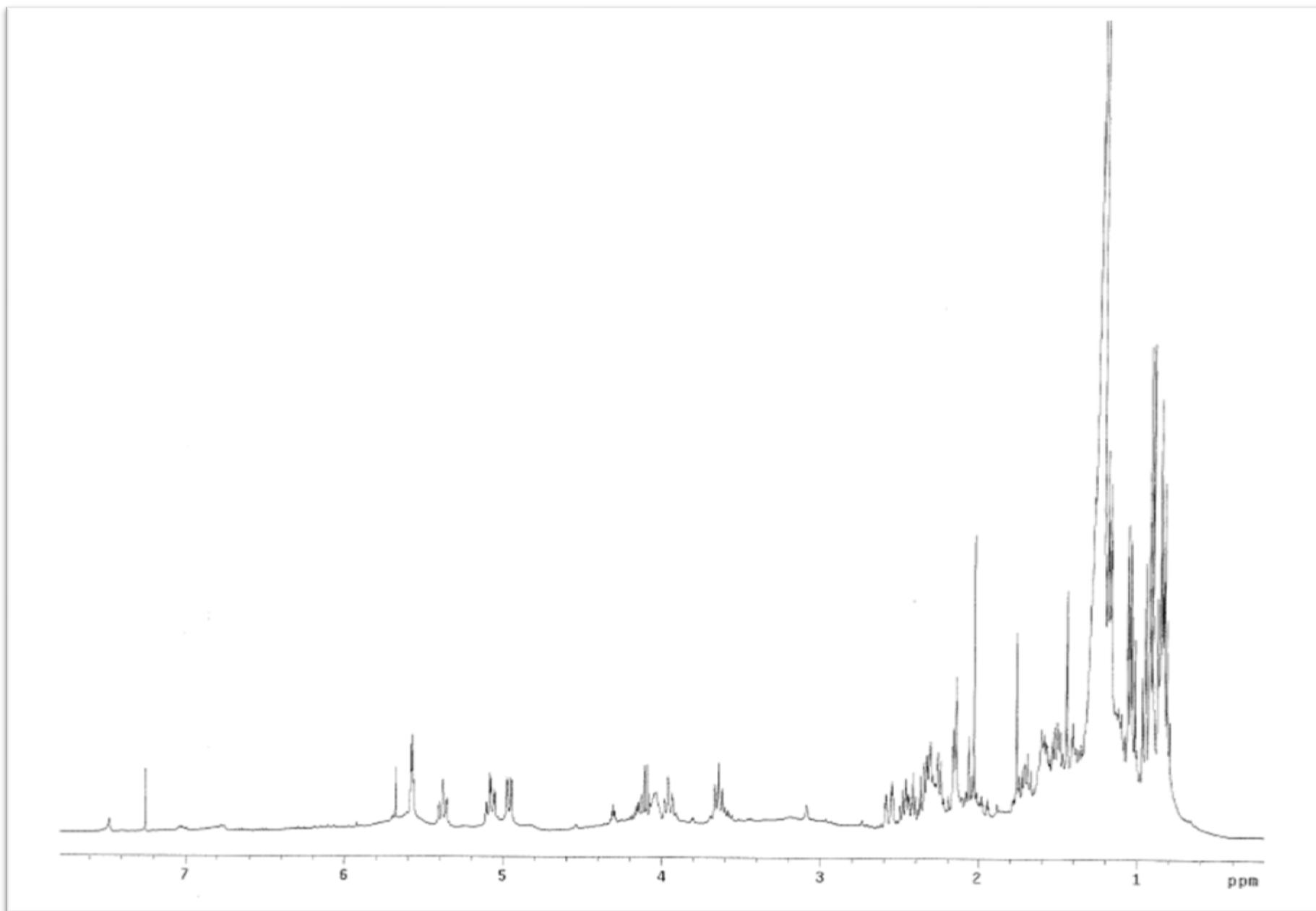
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de P7 - $\alpha$  amirina



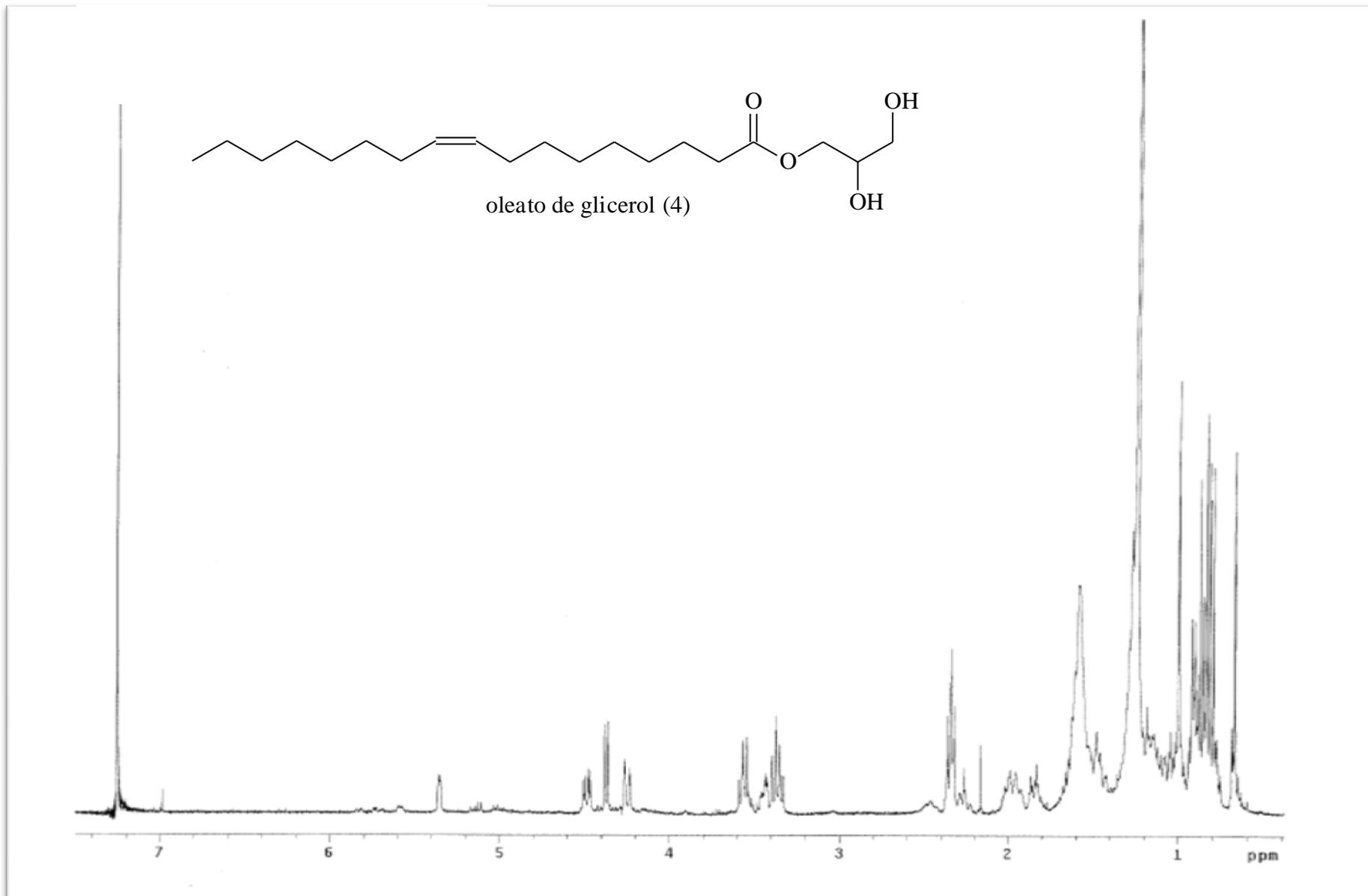
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de P8 - Estigmasterol



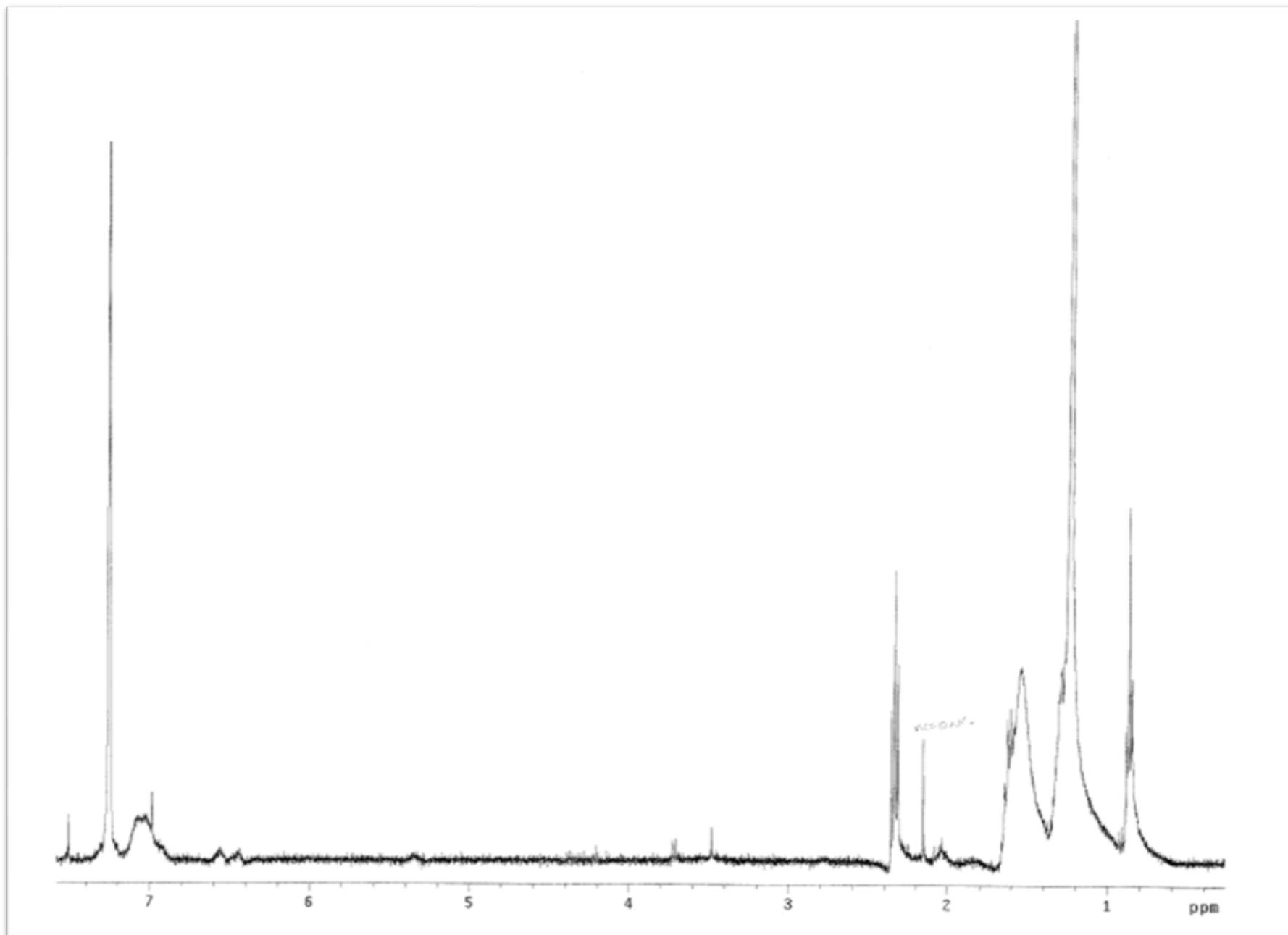
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de P9 -  $\beta$ -Sitosterol



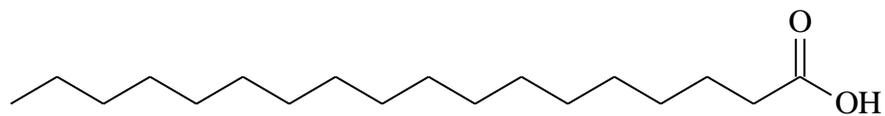
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de P10



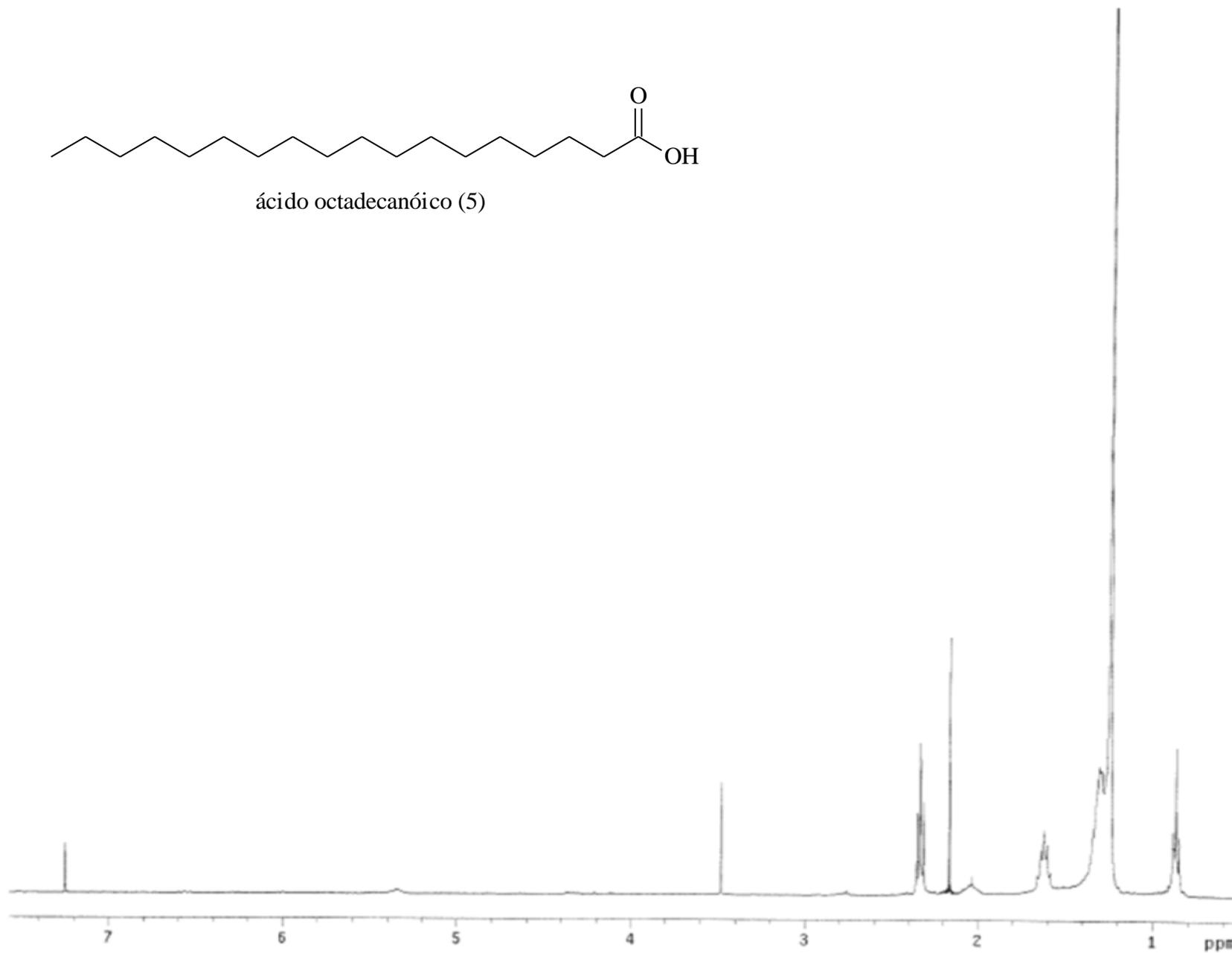
Espectro RMN-<sup>1</sup>H de P11 – Oleato de glicerol



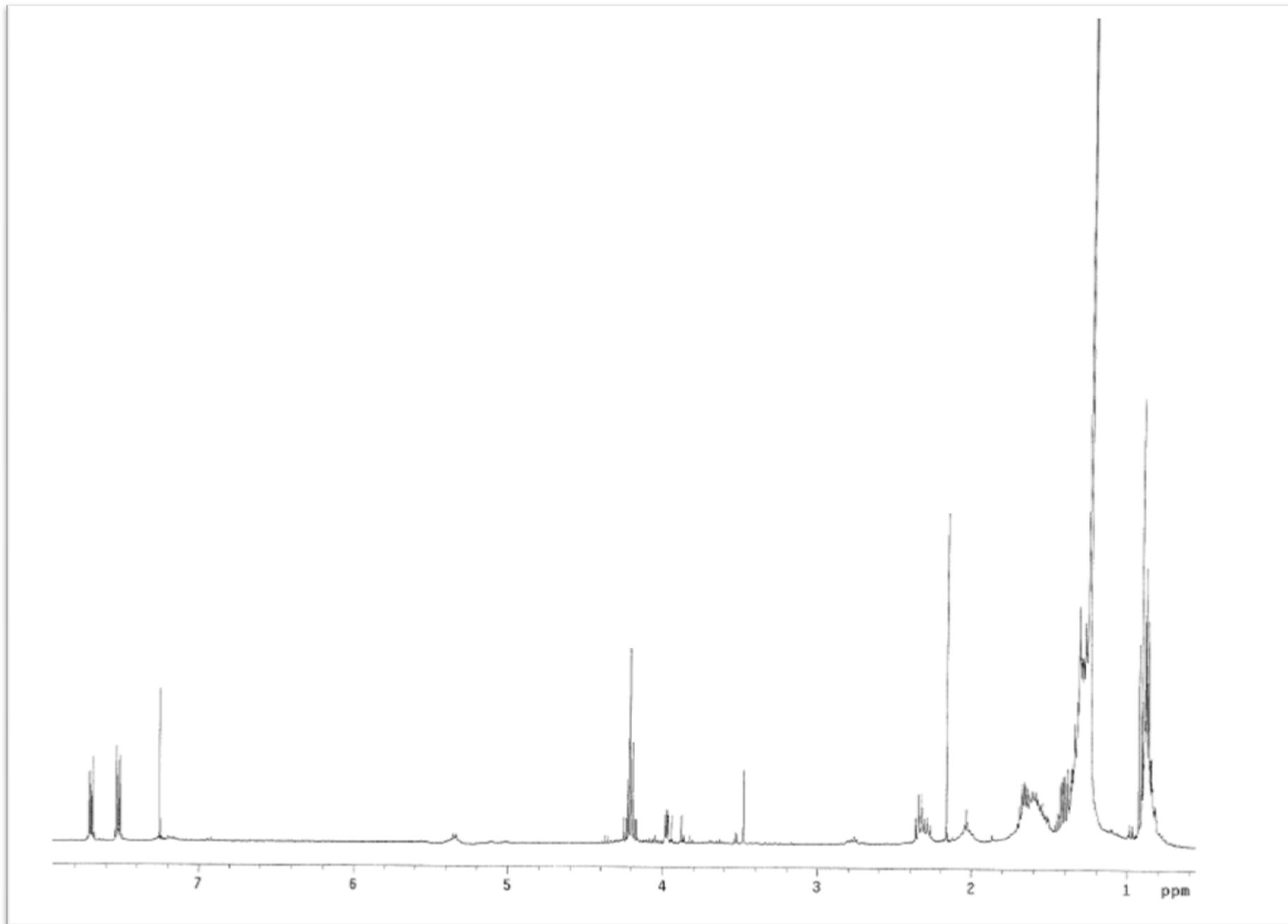
Espectro RMN- $^1\text{H}$  de P12



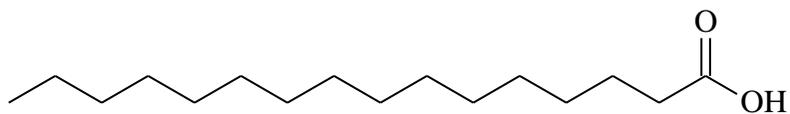
ácido octadecanóico (5)



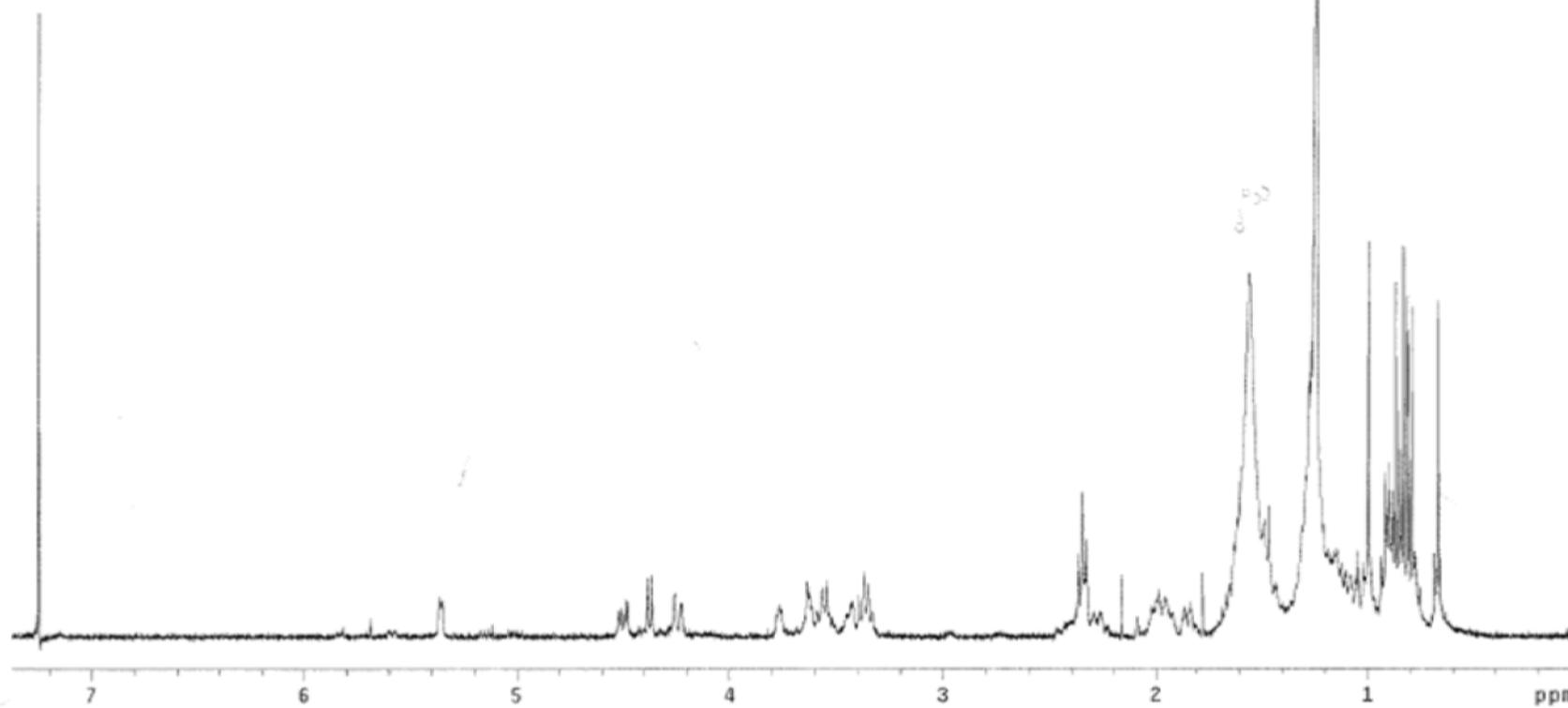
Espectro RMN-<sup>1</sup> Hde P13 – Acido octadecanóico



Espectro RMN- $^1\text{H}$  de P14



ácido hexadecanóico (7)



Espectro RMN-<sup>1</sup>H de P15 – Acido hexadecanóico



## CONCLUSÕES GERAIS

1. As espécies de *Solanum* estudadas apresentaram efeito alelopático influenciado pelos fatores abióticos (seca e chuva) e pela idade do órgão (folhas jovens e adultas), bem como a variabilidade entre as espécies.
2. O efeito do extrato aquoso de folhas coletados na época da chuva foi mais pronunciado nos parâmetros da germinação para *S. granuloso-leprosum* e *S. subumbellatum* e o efeito dos extratos de folhas coletadas na época de seca foram mais ativos para os extratos de folha de *S. lycocarpum*;
3. Os extratos aquosos das folhas jovens e adultas tiveram modo de ação diferentes dentro da germinabilidade e tempo médio;
4. O estresse causado no período de seca afetou diretamente a presença de aleloquímico nas folhas das espécies estudadas reduzindo o crescimento do gergelim.
5. A parte radicular foi o órgão mais afetado pela presença dos extratos e a parte aérea, nas concentrações mais baixas, sofreu estímulo no seu crescimento;
6. As folhas jovens apresentaram maior efeito inibitório no crescimento do gergelim do que as folhas adultas.
7. Dentre os extratos avaliados de baixa e alta polaridade, o extrato de diclorometano foi, na grande maioria das espécies estudadas, o mais ativo, mantendo a sua fitotoxicidade mesmo na concentração mais baixa;
8. As folhas jovens mostraram maior atividade inibitória do crescimento de coleótilo na grande maioria das espécies;
9. Dentre as espécies de *Solanum* estudadas, o extrato de diclorometano de folhas jovens e adultas de *S. granuloso-leprosum* se mostrou mais ativo e por isso foi fracionado e purificados seus produtos ativos;
10. Os produtos encontrados nas frações que mostraram fitotoxicidade no crescimento de coleótilo foram uma lactona sesquiterpênica (loliolida) e um carotenóide (luteína) sendo a ocorrência desses inéditos para *S. granuloso-leprosum*.

11. Os maiores rendimentos nas extrações foram dos extratos de maior polaridade, como o aquoso e o metanólico;
12. No bioensaio com coleóptilo estiolado de trigo, as frações líquido-líquido foram as que demonstraram maior atividade inibitória;
13. O efeito fitotóxico dos extratos e frações foi maior no crescimento da parte aérea e radicular das espécies alvo do que na germinação das sementes;
14. A espécie-alvo mais sensível à ação dos compostos fitotóxicos foi o tomate e as menos sensíveis, a cebola e alface;
15. O extrato mais ativo foi o de acetona e as frações líquido-líquido diclorometano e acetato de etila demonstraram maior efeito fitotóxico;
16. Os compostos isolados do extrato de diclorometano e acetona foram 2 esteróides (estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol), 1 triterpeno ( $\alpha$ -amirina) e 2 ácidos graxos (ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico) e 1 éster de ácido graxo (oleato de glicerol) totalizando 6 produtos identificados dos extratos mais ativos de folhas jovens de lobeira.