

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

**“EFEITO ALELOPÁTICO DE *ANDIRA HUMILIS* MART. EX BENTH. E DE
ANACARDIUM HUMILE MART. NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE
LACTUCA SATIVA L. E DE *RAPHANUS SATIVUS* L.”**

FERNANDO PERIOTTO

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS – SP

2003

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

P445ea Periotto, Fernando.
Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart.ex Benth. e de
Anacardium humile Mart. na germinação e no crescimento
de *Lactuca sativa* L. e de *Raphanus sativus* L. / Fernando
Periotto. – São Carlos : UFSCar, 2003.
64 p.

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

1. Alelopatia. 2. Germinação. 3. Crescimento de
plântulas. 4. *Andira humilis*. 5. *Anacardium humile*. 6.
Metabólitos secundários. I.Título.

CDD: 581.23 (20^a)

Orientadora: Prof^a. Dr^a.

Sonia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a.

Maria Inês Salgueiro Lima

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, orientação, paz, luz e amor concedidos, permitindo a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Sônia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez, pela oportunidade a mim oferecida de realizar este trabalho sob sua orientação.

À Professora Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, pela co-orientação, idéias e sugestões que guiaram e enriqueceram o presente trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN), da Universidade Federal de São Carlos, pelas condições oferecidas, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao aluno doutorando Djalma Santos e ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira do Laboratório de Química de Produtos Naturais (Departamento de Química da UFSCar), pela amizade e pelo acompanhamento e orientação nas análises químicas deste trabalho.

Ao técnico do Departamento de Botânica da UFSCar, Carlos Casale, pelo auxílio e cooperação em vários detalhes deste trabalho.

Aos Membros da Banca de Qualificação: Prof^ª Dra. Silmara Cristina Fanti; Prof. Dr. José Proença Vieira de Moraes e Prof^ª Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, pelas sugestões, correções e comentários, de grande valor para a finalização deste trabalho.

Aos Membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Ivor Bergmann de Aguiar; Prof^ª Dra. Sônia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez e Prof^ª Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, pelas valiosas correções e sugestões oferecidas.

Aos amigos do Departamento de Botânica: Ademir, Casale, Beatriz, Gisele, Gláucia, Letícia, Maria de Lourdes, Regis, Rosangela, Silmara, pela amizade destes anos.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa, durante dois anos de mestrado.

À minha irmã Liliana, pelos textos escritos em inglês contidos neste trabalho.

Em especial, aos meus pais Dalva e Lourival e aos meus irmãos Danilo e Liliana, e à Bruna, pelo amor, paz e alegria, que ajudaram na realização deste trabalho.

À todas pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	VI
Lista de Figuras	VII
Resumo Geral	X
Introdução Geral	1
Alelopatia	1
A vegetação de cerrado e o seu potencial alelopático.....	3
Referências Bibliográficas	6
CAPÍTULO I: EFEITO ALELOPÁTICO DE <i>ANDIRA HUMILIS</i> MART. EX BENTH. NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE <i>LACTUCA SATIVA</i> L. E <i>RAPHANUS SATIVUS</i> L.	9
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	14
Conclusão	16
Referências Bibliográficas	20
CAPÍTULO II: EFEITO ALELOPÁTICO DE <i>ANACARDIUM HUMILE</i> MART. NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE <i>LACTUCA SATIVA</i> L. E <i>RAPHANUS SATIVUS</i> L.	22
Introdução	23
Material e Métodos	26

Resultados e Discussão	28
Conclusão	30
Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO III: IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ALELOPÁTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE <i>ANDIRA HUMILIS</i> MART.....	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão	41
Conclusão	47
Referências Bibliográficas	48
Considerações Gerais.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Características físico-químicas e rendimento dos extratos aquosos de caules e folhas de *Andira humilis* de maior concentração, 16% (p/v), utilizados nos bio-ensaios para a verificação de atividade alelopática..... 17

Tabela 2.1. Características físico-químicas e rendimento dos extratos aquosos de caules e folhas de *Anacardium humile* de maior concentração, 16% (p/v), utilizados nos bio-ensaios para a verificação de atividade alelopática. 30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Exemplar de *Andira humilis* Mart. ex Benth. observado na área de reserva de Cerrado pertencente ao *campus* da UFSCar, município de São Carlos (SP).....12
- Figura 1.2.** Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.17
- Figura 1.3.** Velocidade de germinação (dias^{-1}) de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.18
- Figura 1.4.** Porcentagem de germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.18
- Figura 1.5.** Velocidade de germinação (dias^{-1}) de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.19
- Figura 1.6.** Comprimento das plântulas de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.19
- Figura 1.7.** Comprimento das plântulas de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.20

- Figura 2.1.** Exemplar de *Anacardium humile* Mart. observado na área de reserva de Cerrado pertencente ao campus da UFSCar, município de São Carlos (SP)..26
- Figura 2.2.** Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.....31
- Figura 2.3.** Velocidade de germinação (dias^{-1}) de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.....31
- Figura 2.4.** Porcentagem de germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.....32
- Figura 2.5.** Velocidade de germinação (dias^{-1}) de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.....32
- Figura 2.6.** Comprimento total das plântulas de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart..33
- Figura 2.7.** Comprimento total das plântulas de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart..33

Figura 3.1. Esquema do fracionamento do extrato aquoso de folhas de <i>Andira humilis</i>	39
Figura 3.2. Comparação com o controle da inibição em sementes de alface pela ação das sub-frações reunidas (7 e 8), do solvente Acetato de Etila.	40
Figura 3.3. Sub-fração B, em concentração equivalente a 1 mg/mL, com atividade inibitória na germinação de sementes de alface.	41
Figura 3.4. Sub-fração D, em concentração equivalente a 1 mg/mL, com atividade inibitória na germinação de sementes de alface.	41
Figura 3.5. Sub-fração B, submetida à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)	42
Figura 3.6. Sub-fração D, submetida à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)	43
Figura 3.7. Estruturas químicas de taninos encontrados em plantas alelopáticas.	46

RESUMO GERAL

Observações em campo, nas áreas de reserva de Cerrado da Universidade Federal de São Carlos e da Represa do Lobo (Itirapina), indicam que as duas espécies estudadas neste trabalho, *Andira humilis* Mart. ex Benth. e *Anacardium humile* Mart., desenvolvem-se formando espaços entre elas e outras espécies que se desenvolvem ao seu redor. Resultados obtidos em testes preliminares, utilizando-se extratos aquosos de caules e folhas de ambas espécies, demonstraram efeitos inibitórios na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), confirmando a hipótese da presença de agentes alelopáticos. No presente trabalho, foram estudados os efeitos alelopáticos de extratos aquosos de caules e de folhas de *Andira humilis* e de *Anacardium humile* na germinação de sementes e no crescimento plântulas de *Raphanus sativus* L. (rabanete) e *Lactuca sativa* L. (alface), ambas utilizadas como bioindicadores. Efetuou-se, também, a análise dos princípios ativos responsáveis pelos efeitos alelopáticos ocasionados por folhas de *Andira humilis*, procurando-se definir a(s) classe(s) química(s) a que pertencem. Os extratos a 50, 75 e 100% de caules e folhas de *Andira humilis*, em sementes de alface e de rabanete, produziram redução significativa na velocidade de germinação e, a 100% de caules, a porcentagem de germinação foi significativamente reduzida. Em *Anacardium humile*, a porcentagem de germinação foi reduzida significativamente, apenas em sementes de rabanete, por ação do extrato de folhas em concentração de 50%. Sementes de alface sofreram redução significativa na velocidade de germinação na presença de extratos de folhas de *Anacardium humile* em todas as concentrações. Entretanto, a velocidade de germinação em sementes de rabanete foi reduzida significativamente, pela ação dos extratos de caules na concentração de 50% e de folhas, nas concentrações 50, 75 e 100%. Plântulas de alface e rabanete sofreram inibição significativa, em seu comprimento, pelos extratos de *Andira humilis*, exceto os extratos de folhas a 25 e 75%, os quais não causaram inibição em rabanete. Extratos de caules de *Anacardium humile* inibiram significativamente o comprimento de plântulas de alface e rabanete, porém os extratos de folhas a 25 e 75% não inibiram o crescimento de plântulas de alface. A interferência dos extratos aquosos, de ambas espécies de Cerrado estudadas, na germinação e no crescimento em alface e rabanete, foi desassociada de qualquer efeito do potencial osmótico e do pH, indicando, portanto, atividade alelopática. Os resultados obtidos na identificação da classe química do(s) composto(s) responsável(is) pela atividade alelopática ocorrida, apontam que as moléculas do metabolismo secundário presentes nas folhas de *Andira humilis*, responsáveis por tais efeitos alelopáticos na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface e de rabanete, pertençam à classe dos taninos.

Introdução Geral

Alelopatia

O termo alelopatia foi criado por Molish (1937) e engloba todas as interferências desencadeadas entre microrganismos e entre vegetais. O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e que o efeito seja realizado por biomoléculas produzidas por uma planta ou por um microrganismo e lançadas no ambiente, seja na água, na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias volatilizadas no ar que cerca os vegetais (Almeida 1988; Rizvi *et al.* 1992).

Tal mecanismo vem sendo observado e pesquisado ao longo da história. Plínio (1 D.C.), citado por Rice (1984), relatou que *Cicer arietinum* L., *Hordeum vulgare* L., *Trigonella foenum-graceum* L., *Vicia ervilia* Willd. e provavelmente *Juglans regia* L., foram motivo de muita preocupação para os homens, devido aos danos causados para as plantas.

Em 1832, De Candolle afirmava que o cansaço das terras, decorrente da monocultura ao longo de anos seguidos, era proporcionado pelo acúmulo de alguma substância exsudada pela cultura, a qual passava a afetar seu próprio desenvolvimento (Rice 1984).

Molish (1937), *apud* Rice (1984) criou o termo alelopatia, unindo as palavras gregas *allelon* e *pathós*, as quais, respectivamente, significam mútuo e prejuízo. Putnam & Duke (1978) utilizaram-no para se referirem aos efeitos danosos de plantas superiores de uma espécie (doadora), na germinação, crescimento ou desenvolvimento de plantas de outras espécies (receptoras). Rice (1984), definiu alelopatia como um efeito direto ou indireto, prejudicial ou benéfico, de um vegetal, compreendendo, também, a ação de microrganismos, sobre outro vegetal, através da liberação de compostos químicos que escapam no ambiente.

Alelopatia envolve uma complexa cadeia de comunicação química entre os vegetais, incluindo os microrganismos (Harborne 1987), e pode ser considerada um componente de interferência, caracterizando-se pela introdução de novos fatores, os compostos químicos, no meio ambiente, o que a distingue de competição, que se dá pela retirada ou redução de fatores do ambiente (Almeida 1988; *apud* Inderjit & Dakshini 1995).

É importante realçar que uma planta pode afetar o crescimento de outra, sem que haja o efeito alelopático, através da competição por algum fator do ambiente como água, luz e nutrientes (RODRIGUES *et al.* 1992). Desse modo, competição e alelopatia podem operar simultaneamente ou em seqüência na natureza, sendo quase impossível, em alguns casos, separá-las (Dakshini *et al.* 1999).

Os compostos químicos com potencial alelopático estão presentes praticamente em todas as partes da planta, incluindo caule, folha, raiz, rizoma, flor, fruto e semente (Souza 1988).

Putnam & Duke (1978) relataram que a principal função dos produtos secundários ou alelopáticos é a proteção dos organismos que os produzem, sendo que sua ação não é muito específica, podendo uma mesma substância desempenhar várias funções, dependendo mais da concentração, translocação e desintoxicação, do que da própria composição química.

A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário, porque na evolução das plantas, representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (Waller 1999; *apud* Ferreira & Aquila 2000).

Ainda não se conhece, com exatidão, o papel das substâncias do metabolismo secundário. Certos autores consideram que os produtos secundários estão sendo constantemente biossintetizados e degradados na célula vegetal com finalidades específicas, obedecendo estritamente o seu código genético, de maneira que os fatores ambientais apenas modulam a sua produção (Swain 1977; Gottlieb 1982; Luckner 1990; *apud* Soares & Vieira 2000). Outros, ainda, baseiam-se no fato de que essas substâncias são produtos finais do metabolismo celular e encontram-se em maior quantidade nos vacúolos celulares, onde seriam armazenados, evitando a autotoxicidade (Whittaker 1970).

O efeito visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores. Portanto, os estudos sobre o efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta, são manifestações secundárias de efeitos ocorridos em nível molecular e celular inicialmente (Ferreira & Aquila 2000). Harborne (1988) apontaram que os metabólitos secundários podem atuar em diversos processos do organismo vegetal, desempenhando várias funções.

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser superficialmente dividido em ação direta e indireta. Nesta última, pode-se incluir modificações nas propriedades do solo, de suas condições nutricionais e das alterações de populações e/ou atividade dos microrganismos. O modo de ação direto ocorre quando o aleloquímico liga-se às membranas celulares da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente em seu metabolismo (Ferreira & Aquila 2000).

Uma diversidade de compostos aleloquímicos já foram identificados, entre eles ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos e glucosinolatos (Putnam & Weston 1986). Os aleloquímicos são, também, considerados importantes recursos para o desenvolvimento de herbicidas, estimulantes para o crescimento de plantas e agentes farmacológicos (Bagchi *et al.* 1997).

A detecção dos efeitos dos metabólitos secundários na germinação de sementes e no crescimento ou desenvolvimento das plantas, é o ponto de partida para a identificação de espécies alelopáticas (Rice 1984).

Bioensaios laboratoriais constituem uma parcela significativa das pesquisas em alelopatia e vários bioensaios têm sido propostos para comprovar a alelopatia sob condições controladas em laboratório (Inderjit & Dakshini 1995).

Comprovada a atividade alelopática, torna-se importante a realização do estudo físico-químico do extrato, verificando, por exemplo, seu pH e seu potencial osmótico e a análise química do mesmo, objetivando a purificação e identificação da(s) molécula(s) ativa(s). Desse modo, torna-se clara a necessidade de uma cooperação multidisciplinar para estudos posteriores.

A vegetação de cerrado e o seu potencial alelopático

O termo cerrado designa uma vegetação de fisionomia e flora próprias, classificada dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana. Muito rico floristicamente, sendo inclusive considerado como a flora mais rica entre as savanas mundiais, destaca-se com relação à biodiversidade devido a sua grande extensão, sua heterogeneidade vegetal e por conter trechos das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul. O cerrado, ainda, contribui com cerca de 5% da diversidade da fauna e flora mundiais e com cerca de 1/3 da biota brasileira (Eiten 1994; Alho & Martins 1995; Klink *et al.* 1995; Klink 1996; *apud* Andrade 2002).

O cerrado ocupa dois milhões de quilômetros quadrados, o que representa cerca de 23% do território brasileiro, sendo considerado o segundo bioma do país em área (Ratter *et al.* 1997; Ribeiro & Walter 1998; *apud* Weiser & Godoy 2001).

O cerrado é notável, também, pela grande variação na fisionomia, apresentando formas florestais, savânicas e campestres (Ribeiro & Walter 1998).

A qualidade do solo do cerrado é um fator que determina o tipo de vegetação característico deste bioma. Sua vegetação ocorre sobre vários tipos de solo, mas a maior parte destes (c. 46%) são solos bem drenados, profundos, submetidos a intenso intemperismo e lixiviação, ácidos, pobres em nutrientes e com altos teores de ferro e alumínio (Goodland & Ferri 1979; Adámoli *et al.* 1987 *apud* Felfili & Felfili 2001).

O íon alumínio pode, também, ser um dos importantes fatores que limita o crescimento das plantas em tais solos (Goodland & Ferri 1979). Na planta, o alumínio causa a inibição do seu crescimento, provavelmente por impedir o influxo de minerais como cálcio, magnésio e fosfato, ou por inibir o crescimento da raiz (Meharg 1994).

Apesar da elevada acidez e baixa fertilidade dos solos, o cerrado está ameaçado por constituir a principal fronteira agropecuária do Brasil, em razão de sua proximidade dos centros consumidores, pela topografia plana e pela estrutura viária satisfatória (Ker *et al.* 1992; *apud* Gomes & Shepherd 2000).

O clima do cerrado é caracterizado pela presença de uma estação seca de 4 a 6 meses de duração, que reduz a disponibilidade de água nas camadas superficiais do solo, enquanto as camadas mais profundas permanecem úmidas (Nardoto *et al.* 1998; Jackson *et al.* 1999; *apud* Kanegae *et al.* 2000).

O déficit hídrico sazonal deve exercer um efeito mais severo em plântulas e indivíduos jovens, cujos sistemas radiculares ficariam mais expostos à escassez de água nas camadas superficiais do solo, característico da época seca. O rápido crescimento radicular e o desenvolvimento de órgãos de reserva são algumas formas de garantir a sobrevivência na seca (Labouriau *et al.* 1963; Handro 1969).

Modelos para explicar o funcionamento de savanas neotropicais consideram as variações sazonais na disponibilidade de água como o principal fator limitante da produtividade vegetal e pressupõem que os elementos arbóreos são capazes de se estabelecerem na matriz herbácea (Medina & Silva 1990 *apud* Kanegae *et al.* 2000).

Apesar da sua importância, existe uma carência de informações florísticas, fitossociológicas, ecológicas e fisiológicas, entre outras, acerca do bioma cerrado, e em muitos locais não foram ainda feitas coletas de material botânico (Felfili *et al.* 1993). Tais fatos, aliados à pequena área deste ecossistema teoricamente protegida em unidades de conservação legalizadas, as quais, em geral, são mal localizadas ou apresentam tamanho insuficiente para proteger a sua biodiversidade, dão uma idéia dos riscos da perda de informações sobre este bioma (Dias 1994).

O bioma cerrado já foi reconhecido como um dos 25 *hot spots* para conservação, em função de sua elevada diversidade biológica sob ameaça pela ocupação desordenada que já converteu mais de 50% da vegetação natural em paisagens antropizadas (Klink *et al.* 1995; Klink 1996; Mittermayer *et al.* 1999; *apud*

Felfili & Felfili 2001). Mesmo as áreas ainda cobertas de paisagem natural sofrem os efeitos da poluição dos recursos hídricos, agrotóxicos, erosão, assoreamento, plantas e animais invasores, extrativismo vegetal e animal predatórios, fatores estes decorrentes da industrialização desenfreada e da falta de consciência preservacionista (Reatto *et al.* 1998 *apud* Silva *et al.* 2002).

Faz-se necessário o investimento nos órgãos de pesquisa, fiscalização, planejamento e gestão para o aperfeiçoamento das estruturas de racionalização e controle dos programas e criação de mecanismos que atuem em nível local, que possam interferir no processo de forma ágil e prática, pois o estabelecimento de estratégias para a conservação da biodiversidade do cerrado é inadiável (Kronka *et al.* 1998).

A carência de áreas de conservação no cerrado pode ser ainda mais evidenciada quando se compara o esforço governamental em conservar os ecossistemas Amazônicos, os quais têm 12% da sua área protegida em Unidades de Conservação, contra menos de 2% no Cerrado (Klink 1996; *apud* Andrade 2002).

KRONKA *et al.* (1998) demonstraram que as áreas de cerrado, no Estado de São Paulo, foram drasticamente reduzidas no período de 1962 a 1992, sendo que nas décadas de 60 e 70, pelo estímulo de políticas públicas, grande parte do cerrado foi devastada. As culturas que mais contribuíram para a redução dessas áreas, foram o reflorestamento com eucalipto e pinus, a cana-de-açúcar impulsionada pelo "pró-álcool", pastagens, culturas temporais e a citricultura. Dessa forma, a total redução no Estado alcançou 87%, resultando na formação de 8353 fragmentos, onde 52,34% deles são menores que 10 hectares e somente 0,46% dos mesmos possuem áreas maiores que 400 hectares.

Estudos básicos de ecofisiologia, bioquímica e de biotecnologia, com a micropropagação de plantas nativas, são importantes para um melhor entendimento dos mecanismos de adaptação das espécies a essa formação vegetal (Gomes & Shepherd 2000).

Além da drástica redução das áreas naturais de Cerrado, pouco se sabe sobre os efeitos alelopáticos de suas espécies sobre a germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas, ou sobre a propagação vegetativa. Desse modo, é importante que se realizem pesquisas nesse campo, para que se tenha melhor conhecimento dos mecanismos de ação, produção e decomposição de compostos alelopáticos, assim como o ciclo desses compostos nas plantas.

Na literatura é possível verificar estudos que confirmam as propriedades farmacológicas de várias espécies utilizadas na medicina popular, demonstradas por análises químicas e biológicas. No entanto, apesar de bastante promissor, esse campo também ainda resente-se da falta de estudos farmacológicos (Almeida *et al.* 1998).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a existência de efeito alelopático nos extratos aquosos de duas espécies subarbustivas nativas dos Cerrados do interior de São Paulo, *Andira humilis* Mart. ex Benth. e *Anacardium humile* Mart., na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.).

Referências Bibliográficas

- Alho, C. J. R. & Martins, E. S. 1995. **De Grão em Grão o Cerrado Perde Espaço (Cerrado – Impactos do Processo de Ocupação)**. Sem paginação. WWF – Fundo Mundial para a Natureza. Brasília.
- Almeida, F. S. 1988. A alelopatia e as plantas. **Boletim circular n. 53**, IAPAR - Londrina, PR., 60 p.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina. **EMBRAPA-CPAC**, xiii + 464p.
- Andrade, L. A. Z.; Felfili, J. M.; Violatti, L. 2002. Fitossociologia de Uma Área de Cerrado Denso na RECOR-IBGE, Brasília – DF. **Acta Botanica Brasilica**. **16**(2): pp. 225-240.
- Bagchi, G. D.; Jain, D. C. & Kumar, S. 1997. Arteether: A potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, **Vol. 45**, Elsevier Science Ltd., n.6, pp. 1131–1133.
- Dakshini, K. M. N.; Foy, C. L. & Inderjit. 1999. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In Inderjit; Dakshini, K. M. N. & Foy C. L. (Eds.). Principles and practices in plant ecology. **Boca Raton, CRC Press**, p. 03-14.
- Dias, B. F. de S. 1994. A conservação da natureza. Pp. 607-663. In: M. N. Pinto (Org.). **Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas**. Editora Universidade de Brasília.
- Eiten, G. 1994. Vegetação do Cerrado. Pp. 17-73. In: M. N. Pinto (Org.). **Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas**. Editora Universidade de Brasília.
- Felfili, J. M.; Silva, Junior, M. C.; Rezende, A. V.; Machado, J. W. B.; Walter, B. M. T.; Silva, P. E. N. & Hay, J. D. 1993. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do Cerrado *sensu stricto* da Chapada da Pratinha, DF-Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **6**(2): 27-46.
- Felfili, M. C. & Felfili, J. M. 2001. Diversidade Alfa e Beta no Cerrado *Sensu Stricto* da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. **15**(2): pp. 243-254.
- Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Ecofisiologia Vegetal**. **12**, edição especial, p. 175-204.
- Gomes, M. A. N. & Shepherd, S. L. K. 2000. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, **v.23**, n.2, pp. 153-159.
- Goodland, R. & Ferri, M. G. 1979. Relações planta-solo. In: **Ecologia do Cerrado** (R. Goodland & M. G. Ferri, eds.). EDUSP, São Paulo, pp. 146-157.

- Handro, W. 1969. Contribuição ao estudo da unidade de dispersão e da plântula de *Andira humilis* Mart. Ex Benth. (Leguminosae-Lotoideae). **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo 347, Botânica 27**: 1-189.
- Harborne, J. B. 1987. Chemical signals in the ecosystems. **Annals of Botany. 60 (suppl.)**: 39-57.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to Ecological Biochemistry. **Academic Press**, London. 382 p.
- Inderjit and Dakshini, K.M.N. 1995. On Laboratory Bioassays in Allelopathy. **The Botanical Review - The New York Botanical Garden, 61 (1)**: 28-44.
- Kanegae, M. F., Braz, V. S. & Franco, A. C. 2000. Efeitos da seca sazonal e disponibilidade de luz na sobrevivência e crescimento de *Bowdichia virgilioides* em duas fitofisionomias típicas do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica, v.23, n.4**, pp. 457-466.
- Klink, C. A.; Macedo, R. F. & Mueller, C. C. 1995. **De Grão em Grão o Cerrado Perde Espaço (Cerrado – Impactos do Processo de Ocupação)**. Sem paginação. WWF – Fundo Mundial para a Natureza. Brasília.
- Klink, C. A. 1996. Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. Pp. 25-27. In: R. C. Pereira, L. C. B. Nasser (Eds.). **Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado, 1st International Symposium on Tropical Savanas – Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e Fibras nos Cerrados**. Embrapa CPAC. Brasília.
- Kronka, F. J. N.; Nalon, M. A.; Matsukuma, C. K. 1998. Áreas de domínio do Cerrado no Estado de São Paulo. **São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente**, 84p.
- Labouriau, L. G.; Válio, I. F. M.; Salgado-Labouriau, M. L. & Handro, W. 1963. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de Cerrados em condições naturais. **Revista Brasileira de Biologia. 23**: pp. 227-327.
- Meharg, A. A. 1994. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptative plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell and Environment. 17**: pp. 989-993.
- Putnam, A. R.; Duke, W. B. 1978. Allelopathy in agroecosystems. **Annals Ver. Phytopathology, v. 16**, p.431-451.
- Putnam, A. R. & Weston, L. A. 1986. The Science of Allelopathy. **Wiley**, New York. p. 43.
- Ribeiro, J. F. Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomia do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M. & Almeida, S. P. 1998. **Cerrado Ambiente e Flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, GO. pp. 89-152.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. **Academic Press Inc.** (London) Ltd..
- Rizvi, S. J. H.; Haque, H.; Singh, U. K. & Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. 1992. Allelopathy: basic and applied aspects. **Chapman & Hall**, London. p.1-10.

- Rodrigues, L. R. de A.; Rodrigues, T. J. D. & Reis, R. A. 1992. Alelopatia em plantas forrageiras. **FCAVJ-UNESP/FUNEP**, Jaboticabal, SP, 1-14.
- Silva, L. O.; Costa, D. A.; Santo Filho, K. do E.; Ferreira, H. D.; Brandão, D. 2002. Levantamento florístico e fitossociológico em duas áreas de Cerrado *sensu stricto* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. **Acta Botanica Brasilica**. **16**(1): pp. 43-53.
- Soares, G. L. G. & Vieira, T. R. 2000. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. *grand rapids*) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta & Ambiente**. **V.7**, n.1, p. 190-197.
- Souza, I. F. 1988. Alelopatia de plantas daninhas. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, 13 (150): p. 75-78.
- Waller, G. R. 1999. Introduction. In Macias, F. A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G. & Cutler H. G. 1999. (Eds.). Recent Advances in Allelopathy. **Cadiz, Serv. Publicaciones, Universidade Cadiz, v.1**, sem paginação.
- Weiser, V. L. & Godoy, S. A. P. 2001. Florística em Um Hectare de Cerrado *Stricto Sensu* na ARIE-CERRADO Pé de Gigante. Santa Rita do Passa Quatro, SP. **Acta Botanica Brasilica**. **15**(2): pp. 201-212.
- Whittaker, R. H. 1970. The biochemical ecology of higher plants. In: Sondeheimer, E. & Simeone, J. B. **Chemical Ecology**. New York Academic, 336 p..

CAPÍTULO I

EFEITO ALELOPÁTICO DE *ANDIRA HUMILIS* MART. EX BENTH. NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE *LACTUCA SATIVA* L. E *RAPHANUS SATIVUS* L.

Fernando Periotto

Sonia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez

Maria Inês Salgueiro Lima

RESUMO – (Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.) Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito alelopático de caules e folhas de *Andira humilis* na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de rabanete e alface. Para os experimentos de germinação foram preparados extratos aquosos de caules e folhas de *A. humilis* nas concentrações de 0, 4, 8, 12 e 16% (p/v). Foram realizadas quatro réplicas de trinta sementes de alface ou rabanete, distribuídas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com 5 mL dos extratos, mantidas a 27°C e na ausência de luz. As contagens das sementes germinadas foram realizadas a cada 12h, calculando-se porcentagem e velocidade de germinação. Extratos de caules e folhas reduziram significativamente a velocidade e a porcentagem de germinação, em relação ao grupo controle. Os experimentos de crescimento foram realizados com quatro réplicas de oito sementes germinadas de alface ou de rabanete, a 27°C, na ausência de luz e em papel-filtro como substrato, sendo avaliadas as concentrações 0, 4 e 12% (p/v). Plântulas de alface e rabanete sofreram inibição significativa em seu comprimento pelos extratos de folhas. Extratos de caules a 4 e 12% (p/v) não causaram inibição do crescimento em rabanete. A interferência dos extratos na germinação e no crescimento em alface e rabanete foi desassociada de qualquer efeito do potencial osmótico e do pH, indicando portanto atividade alelopática.

Palavras-chave: Alelopatia; *Andira humilis*; germinação; crescimento.

ABSTRACT - (Allelopathic effect of *Andira humilis* Mart. ex Benth in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L.) The objective of this study was to evaluate allelopathic effects of stems and leaves of *Andira humilis* in the germination and growth of radish and lettuce. For the germination's experiments, aqueous extracts of stems and leaves of *A. humilis* in the concentrations of 0, 4, 8, 12 e 16% (w/v) were done. Were employed four replicates of thirty seeds of lettuce and radish. The seeds were distributed in Petri dishes with filter paper moistened with 5 mL of the extracts. The experiments were conducted at 27°C in light absence. The counting of germinated seeds was done each 12h, calculating the percentage and germination rate. The extracts at 8, 12 and 16% (w/v) reduced lettuce and radish germination rate, extracts of stems at 100% reduced the percentage of germination. Four replicates of eight germinated seeds of lettuce or radish were employed in the growth experiments conducted at 27°C in the absence of light and having filter paper as substracts moistened with concentrations of 0, 4 e 12% (w/v). Lettuce and radish seedlings, suffered significant inhibition in length, when using leaves extracts. Only 4 e 12% (w/v) stems extracts didn't caused growth inhibition in radish. The interference of extracts in germination and growth of lettuce and radish was disassociated of any pH and osmotic potential, indicating allelopathic activity.

Key words: Allelopathy; *Andira humilis*; growth; germination.

Introdução

Alelopatia é a capacidade dos vegetais superiores ou inferiores produzirem substâncias químicas que, quando liberadas no ambiente influenciam de forma favorável ou desfavorável o desenvolvimento de outros organismos (Rice 1984). Esse fenômeno envolve uma complexa cadeia de comunicação química entre as espécies vegetais (Harborne 1993).

Os efeitos alelopáticos são mediados através de substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros. Essas substâncias químicas estão presentes em diferentes órgãos, incluindo folhas, flores, frutos e gemas de muitas espécies vegetais (Miró *et al.* 1998; Delachiave *et al.* 1999).

A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário vegetal e, na evolução das plantas, representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (Waller 1999).

O efeito visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores. Portanto, os efeitos desses compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta, são manifestações secundárias de efeitos ocorridos em nível molecular e celular inicialmente. Ainda há relativamente poucas informações sobre estes mecanismos (Ferreira & Aquila 2000).

Einhellig (1995) relatou vários mecanismos de ação desempenhados pelos agentes aleloquímicos nos vegetais, os quais atuam nos efeitos da atividade hormonal, na biossíntese e distribuição de metabólitos, na morfologia celular, na fotossíntese, ocasionando efeitos em plantas intactas, células isoladas, cloroplastos e clorofilas, na respiração, atuando nas mitocôndrias e em processos associados à membrana celular, causando acúmulo de íons e interferência nas relações hídricas.

Outros aspectos importantes da alelopatia, além dos fatores que afetam sua produção e liberação no ambiente, incluem sua absorção e translocação no organismo receptor, enfim, sua efetividade como aleloquímico; uma vez esclarecidos, trarão importante contribuição para a compreensão deste fenômeno (Ferreira & Aquila 2000).

Para o efeito alelopático ser constatado, o procedimento inicial consiste na técnica do bioensaio, empregando-se material biológico como indicador da substância em estudo (Inderjit & Dakshini 1995).

Na natureza, alelopatia pode ser confundida com o processo de competição. Rice (1979) aponta que o efeito alelopático consiste na liberação de um composto químico pela planta no ambiente, ao passo que competição é a remoção ou redução de um fator ambiental, tal como água, luz, minerais, etc. Há exemplos claros que alelopatia e competição são fenômenos distintos na natureza, embora possam estar bastante interrelacionados (Ferreira & Aquila 2000).

Além da drástica redução das áreas naturais de cerrado, pouco se sabe sobre os efeitos alelopáticos de plantas nativas na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de outras espécies. Nota-se, portanto, a grande importância da realização de pesquisas nesse campo, para se conhecer os mecanismos de ação, produção e decomposição de compostos alelopáticos, assim como o ciclo desses compostos nas plantas.

Andira humilis Mart. ex Benth. (Leguminosae, Papilionoideae) (Fig. 1.1), é uma espécie que ocorre em cerrado, cerrado ralo e cerrado rupestre, distribuindo-se pelo Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, São Paulo. De hábito subarborescente a arbustivo, atinge até um metro de altura (Almeida *et al.* 1998). A multiplicação dessa espécie no campo ocorre predominantemente pela regeneração vegetativa por meio de sóbols e é conhecida popularmente como Angelim-rasteiro, Angelim-do-campo ou Mata-barata (Ferri 1969).

Handro (1969) estudando aspectos das plântulas e das unidades de dispersão de *Andira humilis*, observou que suas populações nos cerrados, não estão limitadas à multiplicação vegetativa, embora tal comportamento deva ser o mais freqüente, pois não existem impedimentos essenciais intrínsecos para a reprodução sexuada da mesma. Entretanto, é possível que a ocorrência de germinação em condições naturais se dê apenas em alguns anos, nos quais haveria coincidência de sucessivas circunstâncias favoráveis.

Observações de campo permitiram levantar-se a hipótese de que poderia haver efeito alelopático de *Andira humilis* sobre outras espécies vegetais, uma vez que esta espécie forma grupamentos homogêneos, e prejudicam o estabelecimento de outras.

Desse modo, objetivou-se no presente trabalho, avaliar o efeito alelopático dos extratos aquosos de *Andira humilis*, na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.).

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Ecofisiologia de Sementes e de Ecologia Vegetal pertencentes ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O material vegetal foi coletado em áreas de vegetação de cerrado, pertencentes ao *campus* da UFSCar, localizado no município de São Carlos (SP).

Plantas adultas de *A. humilis* foram coletadas na segunda quinzena de fevereiro de 2002. A retirada das porções subterrâneas (caules) e aéreas (folhas) ocorreram com o auxílio de enxadão e tesoura de poda, respectivamente. Este material foi mantido em “freezer”, a -10°C até o momento da extração dos compostos.

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas sementes de *Raphanus sativus* L. cv. “Crimson gigante” (rabanete) e de *Lactuca sativa* L. cv. “Grand rapidis” (alface). Foram efetuados testes preliminares em laboratório, para verificação da viabilidade e do vigor da germinação das sementes.



Figura 1.1. Exemplar de *Andira humilis* Mart. ex Benth. observado na área de reserva de Cerrado pertencente ao *campus* da UFSCar, município de São Carlos (SP).

Os extratos utilizados nos bio-ensaios foram preparados com caules e folhas adultas de *Andira humilis*. O material vegetal foi triturado em liquidificador industrial, na proporção de 33,3 gramas em 200mL de água destilada, ou seja, 16% (p/v). A trituração foi realizada durante três minutos, em temperatura de ambiente de laboratório (25°C), seguida de filtração e posterior obtenção do extrato bruto, 16% (p/v), considerado como o de maior concentração. A partir desse extrato bruto, por diluição em água destilada, foram elaborados os demais extratos: 12%, 8% e 4% (p/v).

Os testes de germinação foram realizados em placas de Petri esterilizadas de 9 cm, contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 5mL de extrato aquoso, com o cuidado de que a solução estivesse bem distribuída. Foram utilizadas quatro réplicas simultâneas de trinta sementes de alface e de rabanete, mantidas em câmaras tipo BOD (modelo NT 708-AT - Nova Técnica) em temperatura constante igual a 27°C e na ausência de luz. Testou-se todas as concentrações do extrato e, como controle, utilizou-se água destilada para umedecer o papel filtro.

Foi medido o pH (*pH / mVMeter UB-10*) e a concentração molar (*Automatic Osmometer Model 5004 μ Osmette™ Precision Systems INC.*), calculando-se posteriormente o potencial osmótico dos extratos de caules e folhas de maior concentração, 16% (p/v), a partir da expressão citada por Vilela *et al.* (1991). Foram preparadas soluções com polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) (Vilela *et al.* 1991), nas concentrações equivalentes às soluções dos extratos e, posteriormente, nessas soluções, foram feitos testes de germinação de sementes e crescimento de plântulas em alface e em rabanete. O rendimento dos mesmos também foi calculado, onde 5 mL do extrato 16% (p/v) foram aplicados em papel filtro e evaporados à secura no interior de uma capela em ventilação por 24 horas, em temperatura ambiente (28°C), pesando-se em balança analítica o resíduo impregnado, descontando-se o peso inicial deste papel filtro seco.

As sementes receberam luz por ocasião das leituras de germinação, que foram realizadas em intervalos de 12 horas, durante 7 dias, considerando-se sementes germinadas as que apresentaram 2 mm de protrusão de radícula (Brasil 1992). Os cálculos para os parâmetros de germinação seguiram expressões citadas em Labouriau & Valadares (1976).

O delineamento experimental do teste de germinação foi inteiramente casualizado, com quatro réplicas de 30 sementes de alface ou de rabanete. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *Softwear Prism –1999* e *GrafPad InStat*, utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de crescimento das plântulas, foram utilizadas as concentrações de extrato, 0, 4 e 12% (p/v). As sementes, previamente germinadas em água, apresentando emissão de raiz primária de cerca de 2mm de comprimento, foram postas em placas de Petri de 09 cm, contendo papel-filtro e vedadas. Foram utilizados 5 mL de extrato por placa, e, como controle, utilizou-se água destilada para umedecer o papel filtro. O experimento foi conduzido em câmaras tipo BOD (modelo NT 708-AT - Nova Técnica), a 27°C e na ausência de luz.

As avaliações para análise de crescimento foram feitas medindo-se o comprimento de plântulas inteiras (distância do ápice da plântula até o ápice meristemático do sistema radicular) de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus*, com 10 dias de idade. Para a obtenção dos parâmetros biométricos, foram feitas quatro réplicas com oito unidades de plântulas, com o auxílio de paquímetro digital, seguindo-se especificações de Benincasa (1988) modificado.

Resultados e Discussão

Nos testes de germinação de sementes de alface os extratos de caules e de folhas de *A. humilis*, na concentração de 16% (p/v), produziram efeitos inibitórios significativos na porcentagem de germinação; nas demais concentrações, o efeito inibitório não foi constatado (Fig. 1.2). No caso da velocidade de germinação destas sementes, notou-se uma redução significativa causada pelos extratos de caules e folhas em concentrações iguais e superiores a 8% (p/v) (Fig. 1.3).

As sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) não sofreram inibição na capacidade germinativa em quaisquer concentrações dos extratos utilizados, exceto caules em 16% (p/v) (Fig. 1.4). Entretanto, a velocidade de germinação dessas sementes foi reduzida significativamente com o uso de extratos de caules e folhas em concentrações iguais e superiores a 8% (p/v) (Fig. 1.5).

Notou-se que nas concentrações onde não houve inibição da germinação, tanto em alface como em rabanete, ocorreu um visível escurecimento (necrose) de pequenas porções das sementes. Em algumas delas houve protrusão radicular, porém, a coifa mostrava-se totalmente oxidada, escurecida e, com o passar do tempo, as mesmas não cresceram mais, ocorrendo o amolecimento e a degradação de seus tecidos.

Para alface e rabanete, os extratos de caules e folhas de *A. humilis* causaram efeitos similares, tanto na germinabilidade como na velocidade de germinação, porém, as sementes de alface apresentaram maior redução da porcentagem de germinação na presença de extrato de folhas a 16% (p/v).

Os extratos aquosos de caules e folhas de *A. humilis*, em todas as concentrações, reduziram em uma relação dose dependente, o desenvolvimento de plântulas de alface (Fig. 1.6). As plântulas de rabanete sofreram inibição significativa do crescimento na presença de extratos de caules, porém, os extratos de folhas testados não inibiram seu crescimento (Fig. 1.7).

Observou-se que as plântulas de alface e de rabanete afetadas apresentaram os hipocótilos de tamanho reduzido, coifas radiculares oxidadas, escurecidas, raízes primárias prejudicadas e coloração escurecida dos cotilédones e hipocótilos.

A mortalidade de plântulas foi observada nos extratos em concentração de 12% (p/v). Extratos de caules nessa concentração, ocasionaram mortalidade de nove plântulas de alface e de oito plântulas de rabanete em seus respectivos testes de crescimento. Os extratos de folhas causaram a morte de nove plântulas de alface. As plântulas de rabanete mostraram-se mais resistentes ao extrato de folhas, não sendo observada qualquer plântula morta.

Observou-se que em sementes e plântulas de alface e rabanete, afetadas pelos extratos de *A. humilis*, não houve regeneração dos tecidos afetados. Do mesmo modo, Medeiros & Lucchesi (1993) demonstraram que extratos aquosos de ervilhaca (*Vicia sativa* L.) exerceram forte influência negativa sobre a germinação de sementes de alface, sendo que, nas concentrações mais elevadas, houve oxidação dos tecidos das sementes, que sofreram rápida decomposição e, por fim, morreram.

Outro aspecto a ser mencionado, é que o efeito alelopático foi mais evidente sobre a velocidade de germinação e sobre o comprimento das plântulas, do que na porcentagem final de sementes germinadas.

Ferreira & Aquila (2000) apontam que a germinação é menos sensível aos aleloquímicos de que o crescimento da plântula, pois as substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns.

O controle do pH e da concentração osmótica dos extratos brutos é fundamental, pois pode haver neles substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos que influem no pH e são osmoticamente ativos e, essa atividade, pode mascarar o efeito alelopático (Ferreira & Aquila 2000). Dessa forma, foram medidos tais fatores físico-químicos nos extratos aquosos de caules e folhas de *A. humilis* (Tab. 1.1).

Na literatura, as informações disponíveis sobre os efeitos do pH sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas, são basicamente referentes às espécies de regiões temperadas. De qualquer modo, esses dados indicam que tanto a germinação como o desenvolvimento, são afetados negativamente, em condições de extrema acidez ou extrema alcalinidade (Souza Filho *et al.* 1996).

As concentrações molares encontradas nos extratos brutos de caules e folhas de *A. humilis* (Tab. 1.1) foram convertidas em valores de potenciais osmóticos (Tab. 1.1). Com os dados de potenciais osmóticos obtidos, foram feitos os testes de germinação de sementes e crescimento de plântulas de alface e de rabanete em solução de PEG 6000, nas concentrações molares e respectivos potenciais osmóticos equivalentes. Assim, pode-se afirmar que os extratos aquosos de caules e folhas de *A. humilis* utilizados no presente trabalho, não foram osmoticamente ativos.

Após a investigação desses fatores, fortalece-se a idéia de que as alterações registradas na germinação e no crescimento de alface e rabanete são causadas por substâncias alelopáticas presentes nos extratos de *Andira humilis*.

Testes preliminares elaborados no presente trabalho, sugerem que as substâncias presentes nas folhas de *A. humilis*, causadoras dos efeitos inibitórios na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface, pertencem à classe dos taninos. Futuros experimentos envolvendo métodos modernos de extração, isolamento e purificação, poderão contribuir para o conhecimento mais acurado dos compostos secundários presentes como agentes alelopáticos em *A. humilis*.

Rizzini (1970) estudou a inibição de germinação ocasionada por embriões de *A. humilis*. A potência dos inibidores aí presentes, foi comparável à do ácido salicílico, da cumarina, da mimosina e do ácido cinâmico. Os inibidores também podem ser encontrados no mesocarpo e na planta adulta dessa espécie, sendo que, mesmo após oito meses de armazenamento dos restos de mesocarpo, ao ar, forte atividade inibitória foi observada.

Conclusão

Com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que as alterações na germinação e no crescimento de alface e rabanete são ocasionadas pelo potencial alelopático de *Andira humilis*.

Tabela 1.1. Características físico-químicas e rendimento dos extratos aquosos de caules e folhas de *Andira humilis* de maior concentração, 16% (p/v), utilizados nos bio-ensaios para a verificação de atividade alelopática.

Extrato aquoso (<i>Andira humilis</i>)	pH	Concentração molar (mOsm)	Potencial osmótico (MPa)	Rendimento (mg.mL ⁻¹)
Folhas	5,45	12	0,030	13,80
Caules	5,39	15	0,038	8,61

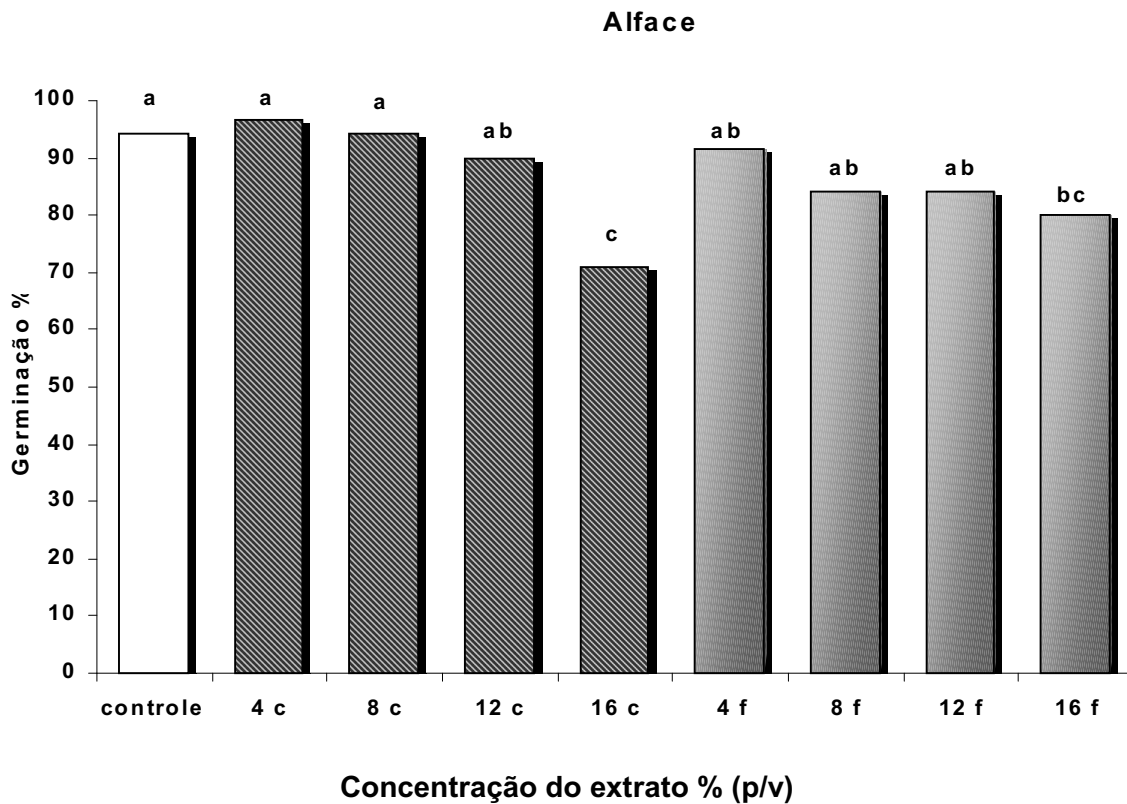


Figura 1.2. Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

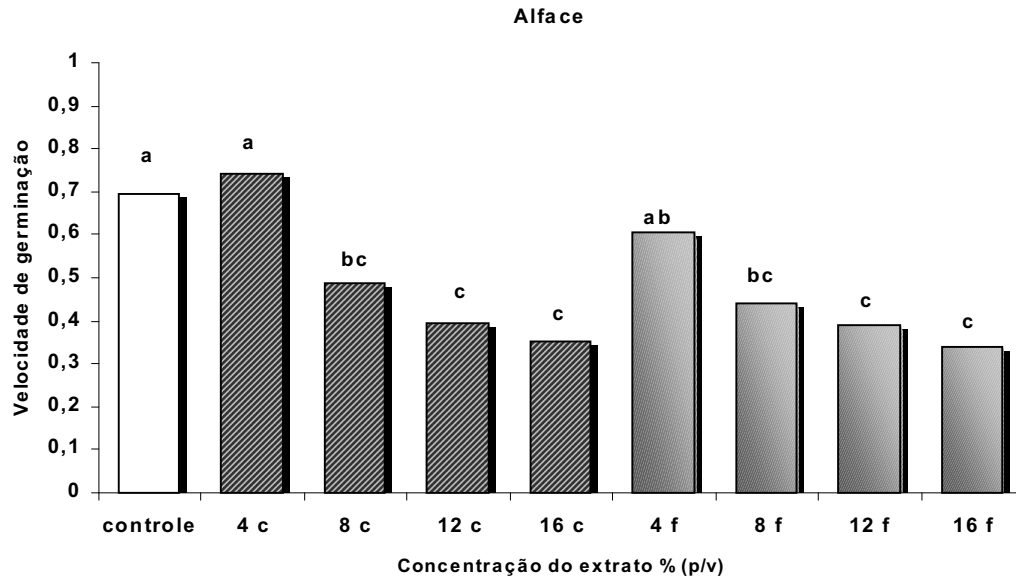


Figura 1.3. Velocidade de germinação (dias⁻¹) de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

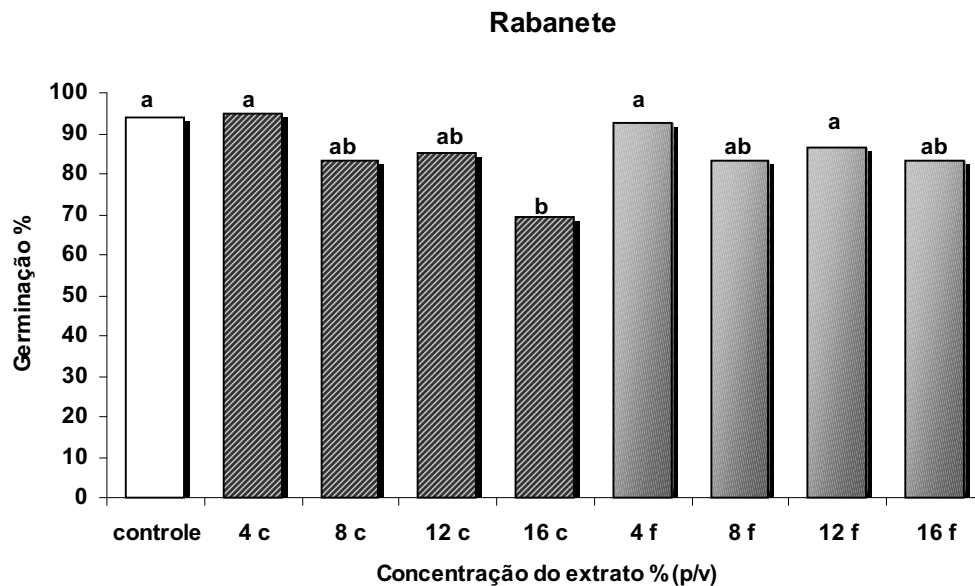


Figura 1.4. Porcentagem de germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

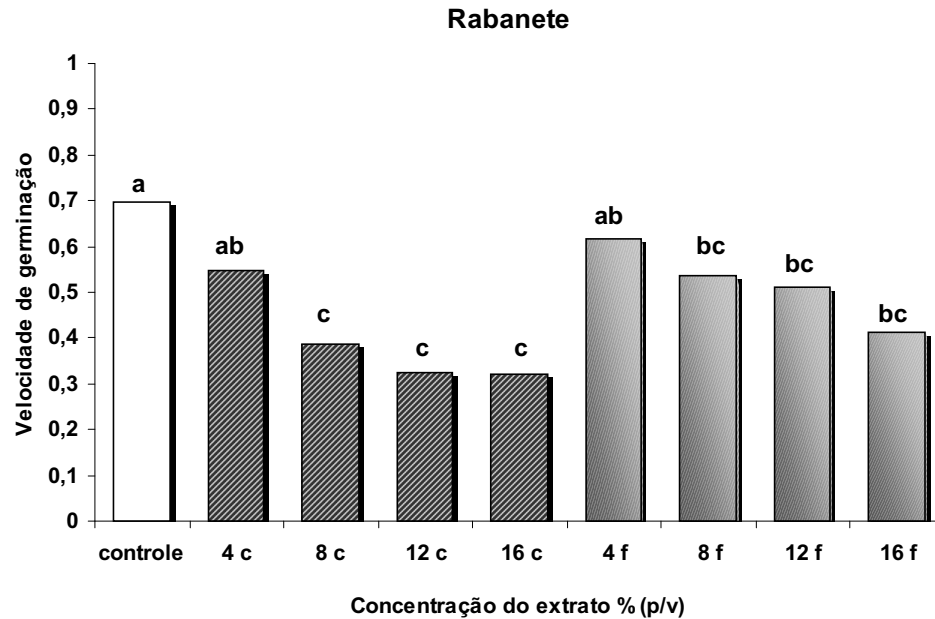


Figura 1.5. Velocidade de germinação (dias⁻¹) de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

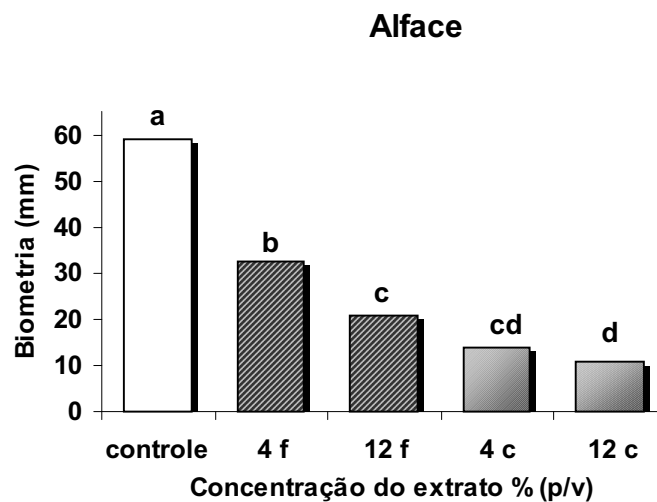


Figura 1.6. Comprimento das plântulas de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

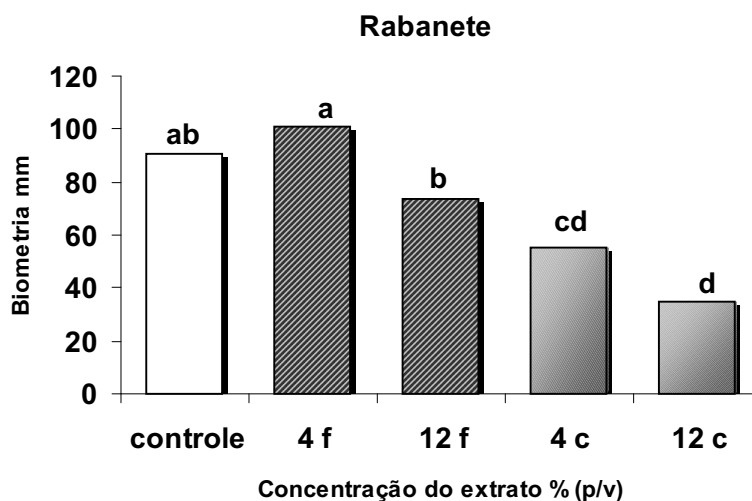


Figura 1.7. Comprimento das plântulas de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Andira humilis* Mart. ex Benth.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Referências Bibliográficas

- Almeida, F. S. 1988. A alelopatia e as plantas. **Boletim circular n. 53**, IAPAR, Londrina. 60 p.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA-CPAC**, xii - 464p.
- Benincasa, M. M. P. 1988. Análise de crescimento de plantas. **FUNEP**, Jaboticabal, SP, 42 p.
- Brasil. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: **SNDA/DNDV/CLAV**, 365 p.
- Delachiave, M. E. A.; Rodrigues, J. D. & Ono, E. O. 1999. Efeitos alelopático de *Losna* (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes** 21(2):265-269.
- Einhellig, F. A. 1995. Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In: Inderjit ; Dakshini, K.M.N. and Einhellig, F.A. 1995. Allelopathy. Organisms, Process and Applications. **American Chemical Society**, Washington, pp. 96-116.

- Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Ecofisiologia Vegetal* 12(**edição especial**):175-204.
- Ferri, M. G. 1969. Plantas do Brasil. Espécies do Cerrado. **Editora Edgard Blücher Ltda. - Edição da Universidade de São Paulo**, 239 p.
- Handro, W. 1969. Contribuição ao estudo da unidade de dispersão e da plântula de *Andira humilis* Mart. ex Benth. (Leguminosae-Lotoideae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 41(2):286-R-287-R.
- Harborne, J.B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. **Academic press limited** – London 318 p.
- Inderjit & Dakshini, K.M.N. 1995. Algal Allelopathy. **The Botanical Review - The New York Botanical Garden**, 61 (1):28-44.
- Labouriau, L. G. & Valadares, M. B. 1976. On the Germination of Seeds of *Calotropis procera*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 48: 174-186.
- Medeiros, A. R. M. & Lucchesi, A. A. 1993. Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília* 28(1):9-14.
- Miró, C. P.; Ferreira, A. G.; Aquila, M. E. A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília* 33(8):1261-1270.
- Rice, E. L. 1979. Allelopathy. An Update. *Botanical Review*, 45: pp.15-109.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. **Academic Press Inc. (London) Ltd.**, 422 p.
- Rizzini, C. T. 1970. Inibidores de germinação e crescimento em *Andira humilis* Benth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42 (Suplemento):329-366.
- Rodrigues, L. R. de A.; Rodrigues, T. J. D. & Reis, R. A. 1992. Alelopatia em plantas forrageiras. **FCAVJ-UNESP/FUNEP, Jaboticabal, SP**, pp.1-14.
- Souza Filho, A. P. da S.; Rodrigues, L. R. de A. & Rodrigues, T. de J. D. 1996. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. *Planta Daninha* 14(2):93-101.
- Vilela, F. A.; Doni Filho, L. & Sequeira, E. L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira Brasília*, 26(11/12):1957-1968.
- Waller, G. R. 1999. Introduction. In: Macias, F. A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G. & Cutler, H. G. (Eds.) Recent advances in allelopathy. **Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz**, v. 1, sem paginação..

CAPÍTULO II

EFEITO ALELOPÁTICO DE *ANACARDIUM HUMILE* Mart. NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE *LACTUCA SATIVA* L. E *RAPHANUS SATIVUS* L.

Fernando Periotto
Sonia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez
Maria Inês Salgueiro Lima

RESUMO – (Efeito alelopático de *Anacardium humile* Mart. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.) Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito alelopático de caules e folhas de *Anacardium humile*, na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de rabanete e alface. Para os experimentos de germinação foram preparados extratos aquosos de caules e folhas de *A. humile* nas concentrações de 0, 4, 8, 12 e 16% (p/v), sendo realizadas quatro repetições de trinta sementes de alface ou rabanete, distribuídas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com 5 mL dos extratos, mantidas a 27°C e na ausência de luz. As contagens das sementes germinadas (≥ 2 mm) foram realizadas a cada 12h, calculando-se porcentagem e velocidade de germinação. A porcentagem de germinação foi reduzida significativamente apenas em sementes de rabanete, por ação do extrato de folhas em concentração de 8% (p/v). Sementes de alface sofreram redução significativa na velocidade de germinação na presença de extratos de folhas em todas as concentrações. Entretanto, a velocidade de germinação em sementes de rabanete foi reduzida significativamente pela ação dos extratos de caules na concentração de 8% (p/v) e de folhas nas concentrações 8, 12 e 16% (p/v). Os experimentos de crescimento foram realizados com quatro repetições de oito sementes germinadas de alface ou de rabanete, a 27°C, na ausência de luz e em papel-filtro como substrato, testando-se as concentrações 0%, 8% e 12%. Plântulas de alface e rabanete, sofreram inibição significativa em seu comprimento pelos extratos de caules. Apenas os extratos de folhas a 4 e 12% (p/v) não inibiram o crescimento de plântulas de alface. A ação dos extratos na germinação e no crescimento em alface e rabanete foi desassociada de qualquer efeito do potencial osmótico e do pH, indicando portanto atividade alelopática.

Palavras-chave: Alelopatia; *Anacardium humile*; germinação; crescimento.

ABSTRACT - (Allelopathic effect of *Anacardium humile* Mart. in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L.) The objective of this research was to evaluate the allelopathic effect of stems and leaves of *Anacardium humile*, in the germination and growth of radish and lettuce seeds. For the germination experiments, aqueous extracts of stems and leaves of *A. humile* in the concentrations of 0, 4, 8, 12 and 16% (w/v), and four repetitions of thirty seeds of lettuce and radish were done, distributed in Petri dishes covered with filter paper moistened with 5 mL of the extracts, kept at 27°C and light absence. The counting of germinated seeds (≥ 2 mm) was done each 12h, calculating the rate and germination speed. Only radish seeds were significantly affected by extracts of leaves in 8% (w/v) concentration. Seeds of lettuce presented significant reduction in the germination rate in all concentrations of leaves extracts. However the germination rate in radish seeds was significantly reduced for extracts of stems in 8% (w/v) and of leaves in 8, 12 e 16% (w/v) concentrations. Growth experiments were done with four repetitions of eight germinated seeds of lettuce or radish, at 27°C, in light absence and having filter paper as substracts, being tested in concentrations of 0%, 4% and 12% (w/v). Lettuce and radish, presented significant inhibition in its lengths when using stems extracts. Leaves extracts of concentrations 4% and 12% (w/v) only didn't cause inhibition of growth in lettuce. The interference of extracts in germination and growth in lettuce and radish was disassociated of any pH and osmotic potential influence, indicating allelopathic activity.

Key words: Allelopathy; *Anacardium humile*; growth; germination.

Introdução

Em 1937, Hans Molisch cunhou o termo alelopatia, fazendo referência à capacidade das plantas de interferirem de modo danoso ou benéfico na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas por meio da liberação de substâncias no solo ou na atmosfera (Medeiros 1990).

Segundo Rice (1984), o termo pode ser empregado para caracterizar interações bioquímicas que ocorrem entre todos os tipos de plantas, inclusive entre microrganismos. Alguns autores definiram alelopatia apontando os efeitos de um vegetal sobre os outros, ressaltando a inibição do desenvolvimento provocada por substâncias produzidas por plantas que estão próximas (Piña-Rodrigues & Lopes 2001).

Os vegetais, quando vivos ou mortos, liberam certos compostos químicos no ambiente denominados alelopáticos, os quais podem afetar o crescimento das plântulas e a germinação das sementes de outras espécies, situados em suas proximidades. Observações na natureza, em alguns casos, auxiliam na identificação de plantas qualificadas como agressivas, as quais liberam tais compostos, bem como das susceptíveis ou receptoras (Ferreira & Aquila 2000).

As moléculas com propriedades alelopáticas, produtos do metabolismo secundário de uma planta, podem ser lançadas no ambiente em fase aquosa após uma chuva, lixiviada através do sereno, excretadas pela raiz, volatilizadas no ar por meio de substâncias gasosas, ou então liberadas após a decomposição dos tecidos vegetais (Rizvi *et al.* 1992; Medeiros & Lucchesi 1993; Larcher 2000).

No caso das plantas lenhosas, existem aspectos importantes que as distinguem das demais, quanto à alelopatia, como por exemplo, o tempo de decomposição da casca e dos demais elementos lenhosos, que é muito mais longo em relação aos frutos, folhas e flores. Outro fato é a presença de interação persistente com a microflora do solo e seus efeitos alelopáticos por vários anos. Existe também acréscimo de matéria morta na serrapilheira com a queda sazonal de folhas, quando a espécie é caducifólia, ou em escala reduzida, se a espécie é perenifólia. Além disso, ainda há considerável quantidade de lixiviado agregado ao solo, devido à elevada fitomassa da copa (Ferreira & Aquila 2000).

Elaborando um apanhado geral, Medeiros (1990) apontou os produtos químicos mais comuns causadores dos efeitos alelopáticos, estando os mesmos contidos nos grupos das cumarinas, terpenóides, taninos, quinonas complexas, ácidos fenólicos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e derivados do ácido benzóico. Tais compostos, resultantes do metabolismo secundário vegetal, têm como principal função a proteção dos organismos que os produzem, não oferecendo ação muito específica, podendo exercer várias funções, dependendo essencialmente da concentração, da translocação e da desintoxicação do que da própria composição química (Putnam & Duke 1978).

A atividade dos aleloquímicos pode interferir em vários processos fisiológicos de um vegetal, como: o crescimento, a fotossíntese, a assimilação de nutrientes, a síntese de proteínas, a respiração, a permeabilidade da membrana celular e a atividade enzimática. Entretanto, a totalidade da extensão dos mecanismos de ação desses compostos não está totalmente esclarecida (Almeida 1988).

Vários compostos denominados alelopáticos podem ocasionar efeitos prejudiciais ou benéficos para determinadas espécies e, ao mesmo tempo, serem inócuos para outras (Putnam & Duke 1978).

Segundo Gorla & Perez (1997), pesquisas envolvendo alelopatia oferecem ilimitadas oportunidades para contribuir com o aumento do conhecimento da química e da biologia de relações interespecíficas e na resolução de problemas práticos da agricultura. Desse modo, a alelopatia tem sido relatada em questões como regeneração de florestas, recuperação de áreas degradadas, problemas com ervas invasoras, rotação de culturas, consorciação de espécies e adubação verde.

Alelopatia tem sido, também, reconhecida como importante mecanismo ecológico que influencia a dominância vegetal, a sucessão, a formação de comunidades vegetais e de vegetação clímax. Assim, a vegetação de determinada área pode ter o modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas liberadas no ambiente (Miró *et al.* 1998; Ferreira & Aquila 2000).

Para comprovar com segurança que os extratos aquosos têm ação alelopática na germinação das sementes e no crescimento das plântulas, é importante, a verificação de possíveis efeitos físico-químicos (potencial osmótico e pH) que interferem tanto na germinação como no crescimento inicial (Rice 1984; Narwal *et al.* 1997 *apud* Aquila 2000).

Gosmann (1989) destacou outra característica físico-química que sempre deve ser informada: o seu rendimento, sendo este por sua vez, um parâmetro farmacológico que considera a concentração de fitoquímicos extraídos do material vegetal.

O procedimento inicial para a constatação do efeito alelopático consiste na técnica do bioensaio, onde o material biológico, sendo geralmente sementes de uma espécie mais sensível como, por exemplo, *Lactuca sativa* (alface), é empregado como indicador da atividade da substância em estudo.

Em laboratório, costuma-se realizar testes de germinação de sementes e de crescimento de plântulas em extratos aquosos, uma vez que a água é o solvente existente na natureza e, a grande maioria dos produtos secundários com ação alelopática, são liberados na forma de solutos aquosos (Singh *et al.* 1989; Almeida 1990; *apud* Miró *et al.* 1998).

Atualmente, são escassos os dados encontrados na literatura sobre os efeitos alelopáticos exercidos por plantas de cerrado no estabelecimento de outras espécies, ou seja, na germinação de sementes e no desenvolvimento das plântulas. Além disso, a vegetação de cerrado, particularmente no estado de São Paulo, vem sendo drasticamente reduzida desde o início do século passado, restando atualmente apenas pequenas manchas isoladas. Dessa forma, é importante que sejam realizadas pesquisas sobre o potencial alelopático de espécies do cerrado, no sentido de elucidar a produção e a decomposição dessas substâncias, bem como os mecanismos de ação desses metabólitos.

Anacardium humile Mart. é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae, de ocorrência em cerrado e Campo Sujo, distribuindo-se pelo Distrito Federal, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. É um subarbusto hermafrodita de até 80 centímetros de altura, glabro exceto o cálice e a corola; vários ramos eretos, partindo de um xilopódio bem desenvolvido (Almeida 1998). Segundo Coutinho (1979), o caule subterrâneo tem a particularidade de armazenar a água necessária para que a planta resista às secas prolongadas, os ramos só crescem entre setembro de um ano e junho do seguinte, ou seja, durante a estação chuvosa. O desenvolvimento das plantas que crescem em murundus, mostram que enquanto os ramos são soterrados, outros novos afloram à superfície, restabelecendo suas partes aéreas (Fig. 2.1).

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a possível atividade alelopática, em condições de laboratório, dos extratos aquosos de *Anacardium humile* Mart. sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Raphanus sativus* L. (rabanete), utilizados como bio-indicadores.

Material e Métodos

Os experimentos biológicos foram conduzidos no laboratório de Ecofisiologia de Sementes pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O material vegetal para a execução dos experimentos foi coletado na área de reserva de cerrado pertencente ao *campus* da UFSCar, localizado no município de São Carlos (SP).



Figura 2.1. Exemplar de *Anacardium humile* Mart. observado na área de reserva de Cerrado pertencente ao *campus* da UFSCar, município de São Carlos (SP).

Aproximadamente quatro quilogramas de caules e folhas de *Anacardium humile* foram coletados em duas semanas da segunda quinzena do mês de fevereiro de 2002, no período da manhã, em dias ensolarados. O material botânico coletado apresentava-se saudável e em estágio adulto de desenvolvimento. A retirada das porções subterrâneas (caules) e aéreas (folhas) ocorreram com o auxílio de enxadão e tesoura de poda, respectivamente. Este material botânico foi mantido em “freezer”, a -10°C até o momento da extração dos compostos.

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas sementes de *Raphanus sativus* L. cv. “Crimson gigante” (rabanete) e de *Lactuca sativa* L. cv. “Grand rapids” (alface). Foram efetuados testes preliminares em laboratório, para verificação da germinabilidade, do vigor e da homogeneidade de germinação das sementes acima citadas.

Os extratos utilizados nos bio-ensaios foram preparados com caules e folhas adultas de *Anacardium humile*. Em seu preparo, o material vegetal foi triturado em liquidificador industrial, na proporção de 33,3 gramas em 200mL de água destilada. A trituração foi realizada por três minutos, em temperatura de ambiente de laboratório, seguida de filtração e seqüente obtenção do extrato bruto, considerado como o de maior concentração, ou seja, 16% (p/v). A partir desse extrato bruto, foram elaborados os demais extratos de menores concentrações: 12, 8 e 4% (p/v).

Para todos os testes de germinação foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 5mL de extrato aquoso, com o cuidado de que a solução estivesse bem distribuída. Para cada espécie e porção vegetal, foram testadas as seguintes concentrações de extrato: 0%, 4%, 8%, 12% e 16% (p/v). Foram utilizadas quatro repetições simultâneas de trinta sementes de alface e de rabanete, mantidas em estufas tipo BOD (modelo NT 708-AT) em temperatura constante igual a 27°C e na ausência de luz.

Foram avaliadas as características físico-químicas: pH e potencial osmótico dos extratos de caules e folhas na concentração de 100%. O rendimento dos mesmos também foi calculado, onde 5 mL de extrato 100% foram evaporados à secura, pesando-se o resíduo em balança analítica.

As leituras de germinação foram realizadas em intervalos de 12 horas, no período total de 7 dias, considerando-se sementes germinadas as que apresentaram 2 mm de protrusão de radícula (Brasil 1992).

Os cálculos para os parâmetros a seguir relacionados foram feitos de acordo com expressões citadas em Labouriau & Valadares (1976).

O delineamento experimental do teste de germinação foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 30 sementes de alface e quatro repetições de 30 sementes de rabanete. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do *Softwear Prism –1999* e *GrafPad InStat*.

Para a análise de crescimento das plântulas, em cada concentração de extrato utilizada, foram postas quatro repetições de dez sementes em placas de Petri de 09 cm de diâmetro, contendo papel-filtro como substrato. As sementes deste teste já apresentavam radícula emitida com cerca de 2mm de comprimento, ou seja, foram previamente germinadas em uma placa controle contendo apenas papel embebido com água destilada. A quantidade de extrato utilizada em cada placa foi equivalente a 5 mL. Foram testadas as seguintes concentrações de extrato: 0%, 4% e 12%. As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC para evitar evaporação, e em seguida, mantidas em estufas tipo BOD (modelo NT 708-AT) em temperatura constante igual a 27°C, na ausência de luz.

As avaliações para análise de crescimento foram feitas com plântulas de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus*, com dez dias de idade (Brasil 1992). Para a obtenção dos parâmetros biométricos, foram feitas quatro repetições com oito unidades de plântulas. A biometria das plântulas foi efetuada com o auxílio de paquímetro digital.

As avaliações para análise de crescimento foram feitas medindo-se o comprimento de plântulas inteiras (distância do ápice da plântula até o ápice meristemático do sistema radicular) de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus*, com dez dias de idade. Para a obtenção dos parâmetros biométricos, foram feitas quatro réplicas com oito unidades de plântulas, com o auxílio de paquímetro digital, seguindo-se especificações de Benincasa (1988) modificado.

Resultados e Discussão

Observou-se, nos testes de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, que os extratos de caules e de folhas de *Anacardium humile*, em todas as concentrações testadas, não produziram efeito inibitório significativo na porcentagem de germinação (Fig. 2.2). No caso da velocidade de germinação, notou-se redução significativa causada pelos extratos de folhas, em todas as concentrações, enquanto que, os extratos de caules não produziram efeito significativo (Fig. 2.3).

As sementes de *Raphanus sativus* sofreram inibição na capacidade germinativa apenas pela ação do extrato de folhas de *A. humile* em concentração de 8% (p/v) (Fig. 2.4). Entretanto, a velocidade de germinação foi reduzida significativamente com o uso de extratos de caules na concentração de 50% e de folhas nas concentrações 8, 12 e 16% (Fig. 2.5).

Nas concentrações onde não houve inibição da germinação, tanto em alface como em rabanete, ocorreu leve escurecimento (início de necrose) em pequenas porções dos cotilédones. Em algumas sementes houve protrusão radicular, porém suas coifas apresentavam-se parcialmente oxidadas. Em certas plântulas, após o escurecimento, cessava o crescimento dos tecidos.

As plântulas de alface foram afetadas significativamente pelos extratos de caules apenas nas concentrações de 4 e 12% e, os extratos de folhas não inibiram o crescimento (Fig. 2.6). Os extratos aquosos de caules e folhas de *Anacardium humile*, em todas as concentrações, ocasionaram interferências negativas significativas no desenvolvimento de plântulas de rabanete, ou seja, o comprimento das plântulas, em todas as concentrações dos extratos, foi reduzido significativamente em relação ao controle (Fig. 2.7).

Observou-se, na presença dos extratos aquosos de *Anacardium humile*, plântulas de alface e de rabanete, com hipocótilos de tamanho reduzido, coifas radiculares oxidadas, escurecidas e raízes primárias prejudicadas. Plântulas anormais e a regeneração dos tecidos afetados, bem como a recuperação do crescimento, não foram observados, o que pode indicar diversas formas com que os aleloquímicos podem influenciar o desenvolvimento de um vegetal.

A interferência do potencial osmótico e do pH na germinação e no crescimento foi descartada, já que os valores obtidos (Tab. 2.1) estão na faixa dos valores adequados para o cultivo de alface e rabanete (Nobel 1991).

Os resultados obtidos, indicam que *Anacardium humile*, uma espécie de vegetação de cerrado, afeta a germinação das sementes e o crescimento de plântulas situadas ao seu redor, visto que os compostos, possivelmente produtos de seu metabolismo secundário, presentes em seus caules e folhas, afetam de algum modo a germinação e o desenvolvimento de alface e de rabanete.

O fato de *Anacardium humile* ser uma espécie sub-arbustiva, possuindo um xilopódio subterrâneo, perene e bem desenvolvido, estando exposto às alterações do ambiente por longos períodos, pode ter favorecido o desenvolvimento da produção de metabólitos secundários que os protegessem. A síntese desses compostos, como por exemplo as xantinas, fornecem poderosos inibidores do crescimento e podem acumular-se no solo junto às plantas, como ocorre nos cafeeiros, sendo inclusive fitotóxicas para as raízes das plantas jovens da própria espécie (Waller *et al.*, 1986; *apud* Ferreira & Aquila 2000).

Gorla & Perez (1997) ressaltaram a importância de estudos na área de ecologia envolvendo alelopatia com sucessão vegetacional, silvicultura, reflorestamento, aparecimento e desaparecimento de espécies, alterações físicas no habitat, produção e dispersão de sementes e competição por recursos. Pesquisas abordando estes fatores poderiam elucidar a vasta complexidade existente entre interações planta-planta e planta-microrganismo, ocasionada pela atividade de metabólitos secundários produzidos.

Conclusão

Os resultados obtidos com extratos aquosos de caules e folhas de *Anacardium humile* indicam a ocorrência de alterações na germinação das sementes e no crescimento das plântulas alface e rabanete confirmando o que a literatura aponta como sendo indicativo de alelopatia.

Tabela 2.1. Características físico-químicas e rendimento dos extratos aquosos de caules e folhas de *Anacardium humile* de maior concentração, 16% (p/v), utilizados nos bio-ensaios para a verificação de atividade alelopática.

Extrato aquoso (<i>Andira humilis</i>)	pH	Concentração molar (mOsm)	Potencial osmótico (MPa)	Rendimento (mg.mL ⁻¹)
Folhas	4,39	52	0	10,33
Caules	5,10	33	0	14,34

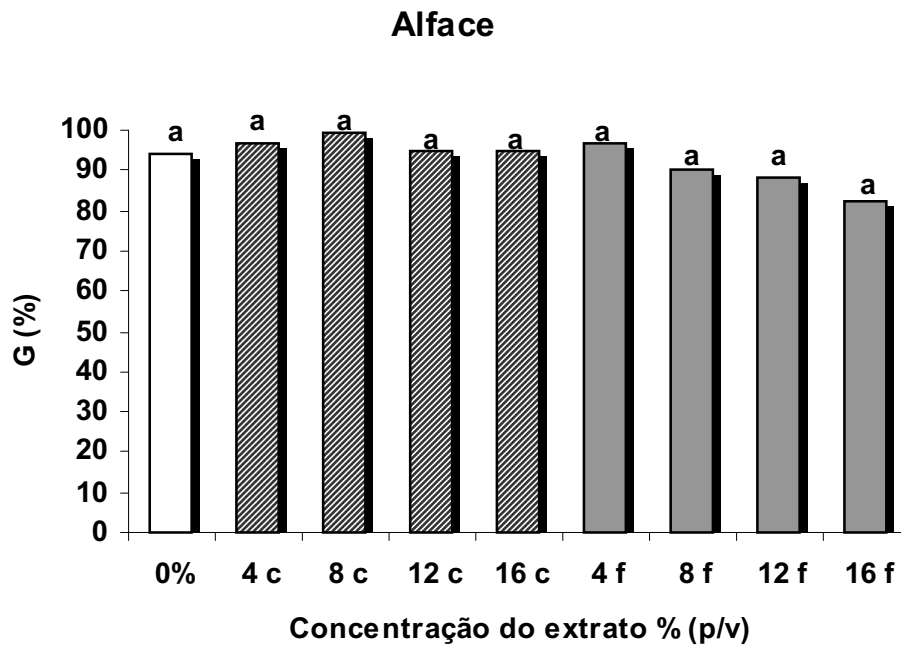


Figura 2.2. Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

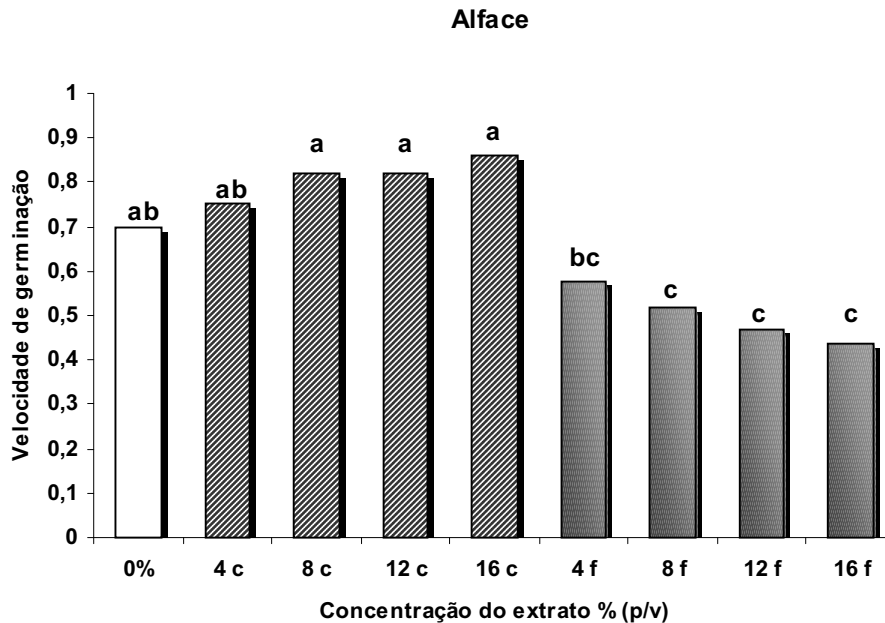


Figura 2.3. Velocidade de germinação (dias⁻¹) de sementes de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

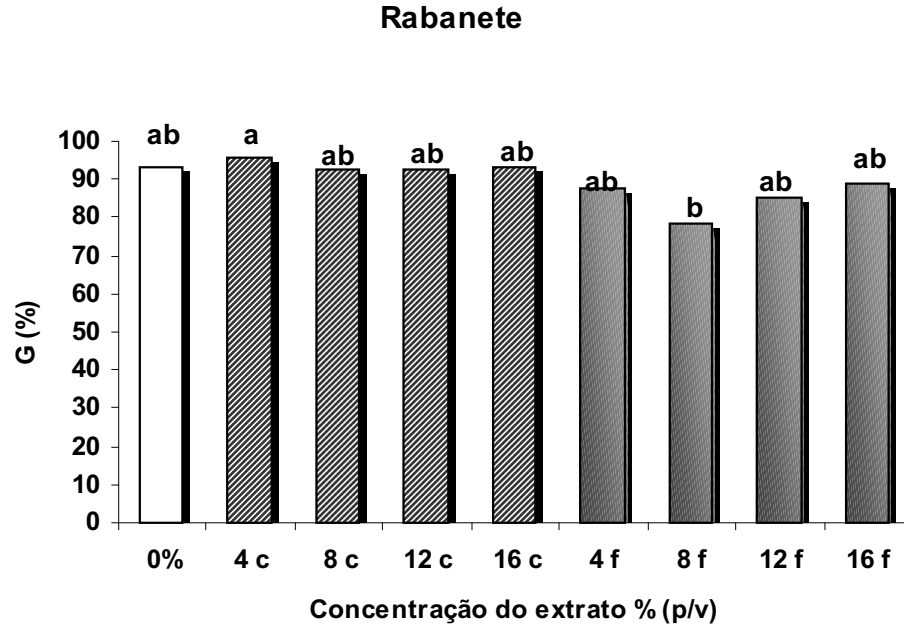


Figura 2.4. Porcentagem de germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

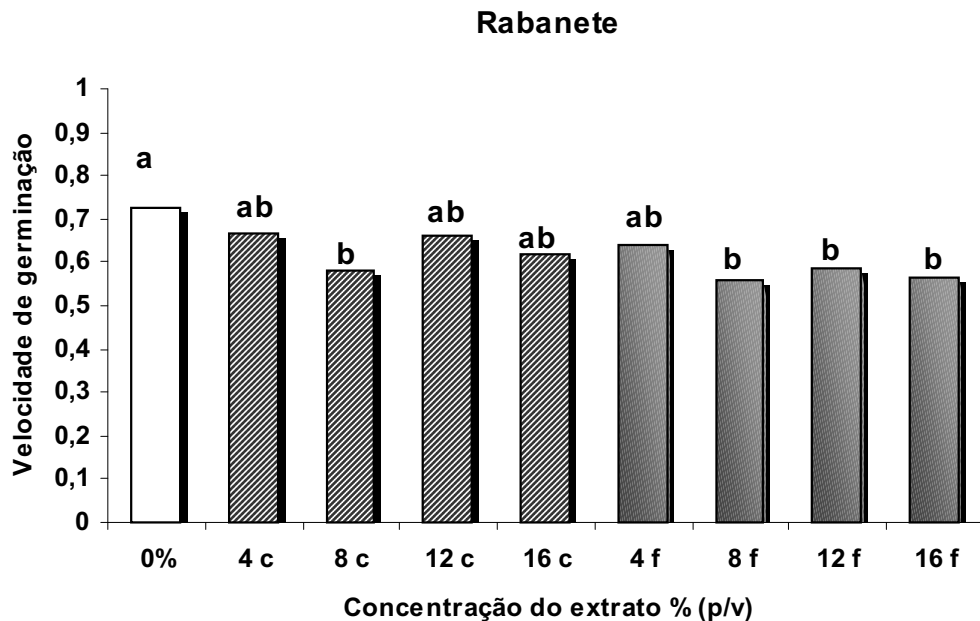


Figura 2.5. Velocidade de germinação (dias⁻¹) de sementes de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

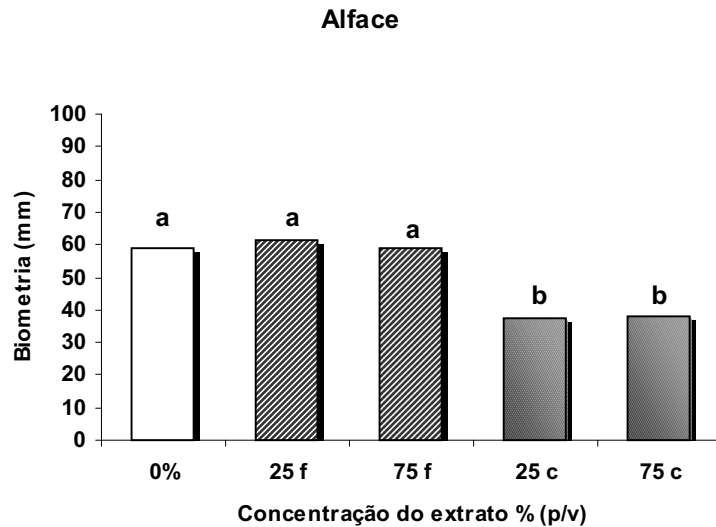


Figura 2.6. Comprimento total das plântulas de *Lactuca sativa* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

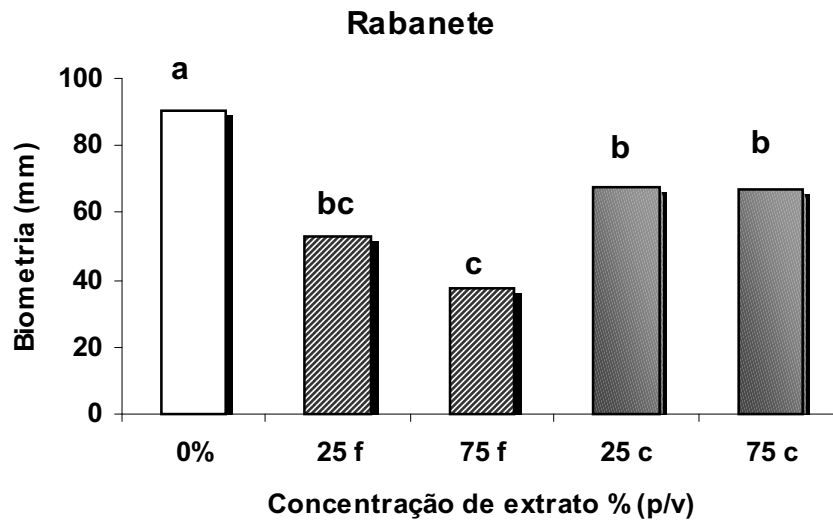


Figura 2.7. Comprimento total das plântulas de *Raphanus sativus* L. sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de caules (c) e folhas (f) de *Anacardium humile* Mart.. Letras iguais sobre as barras, indicam que os valores não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Referências Bibliográficas

- Almeida, F. S. 1988. A alelopatia e as plantas. **Boletim circular n. 53**, IAPAR - Londrina, PR., 60 p.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA-CPAC**, xii - 464p.
- Benincasa, M. M. P. 1988. Análise de crescimento de plantas. **FUNEP**, Jaboticabal, SP., 42 p.
- Brasil. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: **SNDA/DNDV/CLAV**, 365 p.
- Coutinho, L. M. 1979. Aspectos ecológicos da saúva no Cerrado – o reconhecimento das plantas do estrato herbáceo subarbustivo pelos murundus de terra e suas adaptações. In: Congresso Nacional de Botânica, 30, Campo Grande, MS. **Resumos, Campo Grande: Sociedade Botânica do Brasil**, p.179.
- Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Ecofisiologia Vegetal**. 12, edição especial, p. 175-204.
- Gorla, C. M. & Perez, S. C. J. G. A. 1997. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.19, n. 2, p.261-266.
- Gosmann, G., Schenkel, E. P., Seligmann, O. 1989. A new saponine from Mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 52, n. 6, p. 1367-1370.
- Labouriau, L. G. ; Valadares, M. B. 1976. On the Germination of Seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 48: 174-186.
- Larcher, W. 2000. Ecofisiologia Vegetal. **RiMa artes e textos**, p. 26-28.
- Medeiros, A. R. M. 1990. Alelopatia: Importância e suas aplicações. **Horti Sul**. v. 1, n. 3, p. 27-32.
- Medeiros, A. R. M. & Lucchesi, A. A. 1993. Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v. 28, n. 1, p. 9-14.
- Miró, C. P.; Ferreira, A. G.; Aquila, M. E. A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília.v 33, n.8, p.1261-1270.
- Nobel, P. S. 1991. Physiological and Environmental Plant Physiology. **San Diego: Academic Press**, 635p.
- Piña-Rodrigues, F. C. M. & Lopes, B. M. 2001. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p.130-136.
- Putnam, A. R.; Duke, W. B. 1978. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Rev. Phytopathology**, v. 16, p.431-451.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. **Academic Press Inc.** (London) Ltd..
- Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. 1992. Allelopathy: basic and applied aspects. **Chapman & Hall**, London. p. 443-472.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ALELOPÁTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE *ANDIRA HUMILIS* MART.

Fernando Periotto
Sonia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade Perez
Djalma Antônio Pereira dos Santos
Paulo Cezar Vieira
Maria Inês Salgueiro Lima

RESUMO – (Estudo dos constituintes químicos alelopáticos isolados de folhas de *Andira humilis* Mart.). No presente trabalho objetivou-se identificar a classe do(s) composto(s) presentes nas folhas de *Andira humilis* responsável(is) pela atividade alelopática ocorrida em estudos anteriores, utilizando-se extratos aquosos das folhas dessa espécie na germinação de sementes e no crescimento das plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.). Para tanto, fracionou-se o extrato aquoso bruto de folhas de *Andira humilis*, inicialmente submetendo-o a uma partição líquido-líquido, seguindo-se um gradiente crescente de polaridade, em seguida, a partição acetato, que apresentou atividade alelopática, foi levada a um fracionamento em coluna, à vácuo, utilizando-se sílica comum como suporte cromatográfico e um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade. A fração (7+8), que foi previamente reunida, apresentou efeitos alelopáticos em concentração equivalente a 1 mg/mL. Desse modo, fracionou-a em coluna, utilizando *Sephadex* como suporte cromatográfico e metanol como solvente. Deste fracionamento, obteve-se 5 sub-frações, onde duas delas, em concentração equivalente a 1 mg/mL, inibiram a germinação em testes biológicos e foram submetidas à experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H). Com os resultados obtidos, sugere-se que as moléculas do metabolismo secundário presentes nas folhas de *Andira humilis*, causadoras dos efeitos alelopáticos na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface e de rabanete, pertençam à classe dos taninos.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; taninos; alelopatia; *Andira humilis*; germinação.

ABSTRACT – (Study of allelopathic chemical components isolated in leaves of *Andira humilis* Mart.). The objective of this paper was to identify the class of compounds found in leaves of *Andira humilis* responsible by the allelopathic activity found in early studies, using aqueous extracts of leaves from this species in germination of seeds and in the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). So that, the raw aqueous extract of *Andira humilis* leaves was fractionated, initially submitting being submitted to a liquid-liquid partition, following by an increasing polarity gradient and subsequently to an Acetat partition that presented allelopathic activity, then it was taken to a vacuum column fractioning using common silica as a chromatographic substract and a gradient of solvents in crescent order of polarity. The fraction (7+8) that was previously reunited presented allelopathic effects in concentrations equivalent of 1 mg/mL, hence it was column fractionated using *Sephadex* as chromatographic substract and methanol as solvent. This fractioning resulted in 5 sub-fractions, where two of them, in concentration equivalent of 1mg/mL, which inhibited germination in biological tests and were submitted to experimentations of Hidrogen Nuclear Magnectic Ressonance (RMN ¹H). The results obtained suggest that the molecules of secondary metabolism found in *Andira humilis* leaves, which caused allelopathic effects in germination of seeds and growth of lettuce and radish belong to the tannins class.

Key words: Secondary plant compounds; tannins; allelopathy; *Andira humilis*; germination.

Introdução

A alelopatia é o mecanismo de interação química entre plantas ou destas com microrganismos. É uma área da ecologia e/ou ecofisiologia das mais complexas. As interações e variabilidade de respostas aproximam-se do caos, sendo este, tomado na sua definição de eventos probabilísticos (Gleik 1990). Há também em alelopatia, envolvimento de interações entre estresses abióticos e bióticos através de múltiplos compostos que podem ter relações sinérgicas, potencializando suas ações (Einhellig 1999). Assim sendo, os estudos em alelopatia não podem ser explicados através da abordagem de uma disciplina, mas deve ser multidisciplinar (Rizvi *et al.* 1992).

A importância das interações químicas entre os vegetais superiores é, sem dúvida, insuficientemente pesquisada, mas isto ocorre essencialmente devido à escassez de informações relatando os efeitos alelopáticos nas comunidades naturais de vegetações. Outras dificuldades na compreensão da importância de certos compostos químicos em situações de alelopatia são a complexidade físico-química do solo e a presença de microrganismos no solo que podem converter um determinado produto de uma planta em certos agentes tóxicos e até destruí-lo, de maneira que não ocasione qualquer efeito no tecido do vegetal receptor (del Moral & Cates 1971; *apud* Harborne 1993).

Os efeitos alelopáticos são mediados através de substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, etc. Essas substâncias químicas, com potencial alelopático, estão presentes em muitas plantas e nos diferentes órgãos, incluindo folhas, flores, frutos e gemas (May & Ash, 1990; *apud* Delachieve *et al.* 1999).

Recentes avanços nas pesquisas envolvendo química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, vêm contribuindo para um conhecimento mais apurado de inúmeros compostos secundários produzidos pelos vegetais. Muitos destes compostos são potencialmente aleloquímicos e, variam nas espécies em concentração, localização e composição, podendo ser excretados para o ambiente no solo, no ar ou simplesmente lixiviados. O tempo de residência, a persistência e a transformação do composto podem aumentar, diminuir, ou fazer cessar o seu efeito alelopático devido à ação de microrganismos presentes no solo. Inclusive, o próprio andamento diário do metabolismo primário, com formação de cadeias carbonadas, que varia nas diferentes horas do dia, tem repercussões no metabolismo secundário (Ferreira & Aquila 2000).

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser grosseiramente dividido em ação direta e indireta e, ocorre quando o aleloquímico liga-se às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo. Assim, os efeitos dos aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são apenas manifestações secundárias de efeitos ocorridos inicialmente em nível molecular e celular (Ferreira & Aquila 2000).

Rizvi & Rizvi (1992) apontam que os aleloquímicos podem afetar estruturas citológicas e ultra-estruturais; o balanço hormonal, bem como alterando suas concentrações; membranas e sua permeabilidade; absorção de minerais; movimentos dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; respiração; síntese de proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução; material genético, induzindo alterações no DNA e RNA.

Esses compostos podem também, por exemplo, prevenir a decomposição das sementes, interferir na sua dormência e também na dormência das gemas. São inúmeros os casos de sua atuação sobre o comportamento de organismos associados como, outras plantas, microrganismos, insetos e até animais superiores, inclusive o homem (Harborne 1988).

Os aleloquímicos isolados dos vegetais, têm papel ecológico na natureza como bio-comunicadores e as interações alelopáticas oferecem oportunidades para serem encontrados novos herbicidas naturais, os quais podem ser essenciais para o desenvolvimento futuro da agricultura sustentável (Fischer 1986; Macías *et al.* 1996; *apud* Vaccarini & Bonetto 2000).

Um dos aspectos estudados em alelopatia é o reconhecimento da resposta característica de um organismo em relação aos aleloquímicos, isto é, estimulação (vegetal) ou atração (animal) em baixas concentrações dos aleloquímicos e inibição (vegetal) ou repelência (animal) aos aumentos de sua concentração (An *et al.* 1993; *apud* Peres *et al.* 1998).

O procedimento inicial para a constatação do efeito alelopático consiste na técnica do bioensaio, empregando-se material biológico como indicador da ação da substância em estudo (Inderjit & Dakshini 1995). O passo seguinte consiste na identificação da substância responsável pela atividade, no qual, técnicas analíticas mais elaboradas são requeridas (Lowry *et al.* 1985; Cutler 1986; *apud* Pires *et al.* 2001).

Há grande importância em analisar com cuidado os resultados, que, se significativos, incluirão uma análise química dos extratos, usando-se nesta última etapa, solventes orgânicos, se necessário.

Estudos anteriores, utilizando-se extratos aquosos de folhas de *Andira humilis*, indicaram a ação alelopática na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface) e *Raphanus sativus* (rabanete).

Desse modo, com base nos resultados de estudos anteriores obtidos com extratos aquosos de *Andira humilis*, objetivou-se no presente trabalho, identificar a(s) classe(s) do(s) composto(s) presentes nas folhas desta espécie responsável (is) pela atividade alelopática observada.

Materiais e Métodos

Os experimentos do presente trabalho foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Departamento de Química – DQ/UFSCar) e no Laboratório de Ecofisiologia de Sementes (Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos – DB/UFSCar). O material vegetal (*Andira humilis* Mart. Ex Benth.) foi coletado na área de reserva de Cerrado pertencente ao *campus* da UFSCar, localizado no município de São Carlos (SP).

O extrato aquoso de folhas de *Andira humilis*, na concentração 16% (p/v), (33,33 g / 200 mL), após indicar ação alelopática na realização de estudos anteriores, foi submetido a uma partição líquido-líquido, seguindo-se um gradiente crescente de polaridade. Os solventes utilizados nesta técnica foram Hexano, Acetato de Etila e Álcool n-butílico (Fig. 3.1).

Após identificada (por testes de germinação em sementes de alface) a fração acetato de etila, como sendo a que continha os compostos alelopáticos, realizou-se um fracionamento em coluna, à vácuo, utilizando-se sílica comum como suporte cromatográfico e um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade. Neste caso, foram obtidas oito frações, as quais foram separadas conforme o solvente utilizado, sendo eles: (1) 1^a Diclorometano (100%); (2) 2^a Diclorometano (100%); (3) Diclorometano / Acetato de Etila (70%:30%); (4) Diclorometano / Acetato de Etila (1:1); (5) Diclorometano / Acetato de Etila (30%:70%); (6) Acetato de Etila (100%); (7) Metanol (100%) e (8) Metanol / H₂O (1:1) (Figura 1). As frações (7) e (8), foram reunidas após serem determinadas, por testes de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), suas similaridades quanto à polaridade (Figura 3.1).

Com o teste biológico, notou-se que as frações (7) e (8), as quais tinham sido previamente reunidas (estando na concentração de 1 mg/mL), eram as que apresentavam os efeitos inibitórios mais efetivos na germinação de sementes de alface. Dessa maneira, foi efetuado o fracionamento em coluna, utilizando *Sephadex* como suporte cromatográfico e metanol como solvente. Deste fracionamento, obteve-se cinco sub-frações, onde duas delas (frações B e D), em concentração equivalente a 1 mg/mL, inibiram a germinação de sementes de alface e estas foram submetidas a experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), com o intuito de identificar a(s) classe(s) química(s) das mesmas (Fig. 3.1).

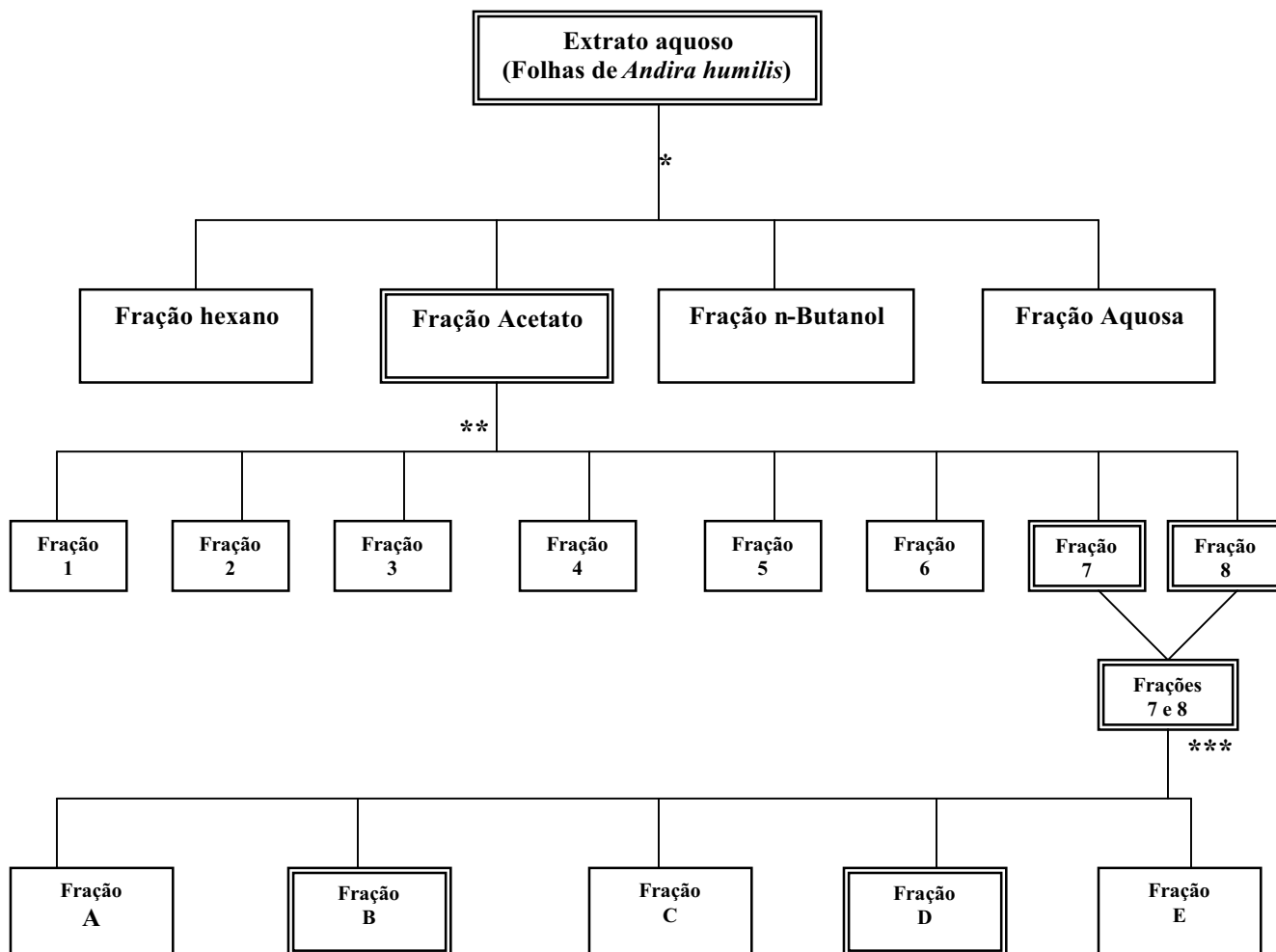



Figura 3.1. Esquema do fracionamento do extrato aquoso de folhas de *Andira humilis*. *Partição líquido-líquido, partindo-se do extrato aquoso de folhas de *Andira humilis* (33,33g de material para 200 mL de H₂O destilada). **Fracionamento utilizando sílica comum como suporte cromatográfico à vácuo e solventes em ordem crescente de polaridade (1) 1^a Diclorometano (100%); (2) 2^a Diclorometano (100%); (3) Diclorometano / Acetato de Etila (70%:30%); (4) Diclorometano / Acetato de Etila (1:1); (5) Diclorometano / Acetato de Etila (30%:70%); (6) Acetato de Etila (100%); (7) Metanol (100%) e (8) Metanol / H₂O (1:1). ***Fracionamento utilizando *Sephadex* como suporte cromatográfico e metanol como solvente. As frações e sub-frações em destaque () foram as que apresentaram atividade alelopática nos bioensaios.

Resultados e Discussão

Na partição líquido-líquido, o solvente acetato de etila extraiu do extrato aquoso, grande parte dos agentes químicos inibidores de germinação e do crescimento. Tal fato foi comprovado posteriormente, utilizando-se essa partição acetato em testes de germinação realizados com sementes de alface.

Depois de obtido esse resultado, fracionou-se a partição acetato em oito sub-partições. Nos testes biológicos, a inibição em sementes de alface ocorreu nas sub-frações 7 e 8, de maiores polaridades, as quais tinham sido previamente reunidas e estavam na concentração de 1 mg/mL (Fig. 3.2). Com esse resultado, a fração reunida (7 e 8) foi posteriormente submetida a novo fracionamento utilizando-se *Sephadex* como suporte cromatográfico, resultando, finalmente, em cinco sub-frações (A, B, C, D e E), encontrando-se atividade inibitória através dos testes de germinação e crescimento, nas frações B e D, em concentração equivalente a 1 mg/mL (Fig. 3.3 e Fig. 3.4).

As sub-frações B e D foram submetidas à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os resultados obtidos na sub-fração B, com a análise do deslocamento químico, em partes por milhão, entre 6,3 e 7,5, sugerem que os átomos de hidrogênio que assim se deslocaram, pertencem às moléculas da classe dos taninos (Fig. 3.5). Já os resultados obtidos na sub-fração D, não possibilitaram uma visualização clara do deslocamento químico em partes por milhão das moléculas aí presentes. (Fig. 3.6).



Figura 3.2. Comparação com o controle da inibição em sementes de alface pela ação das sub-frações reunidas (7 e 8), do solvente Acetato de Etila, as quais tinham sido previamente reunidas e estavam na concentração de 1 mg/mL.



Figura 3.3. Sub-fração B, em concentração equivalente a 1 mg/mL, com atividade inibitória na germinação de sementes de alface.



Figura 3.4. Sub-fração D, em concentração equivalente a 1 mg/mL, com atividade inibitória na germinação de sementes de alface.

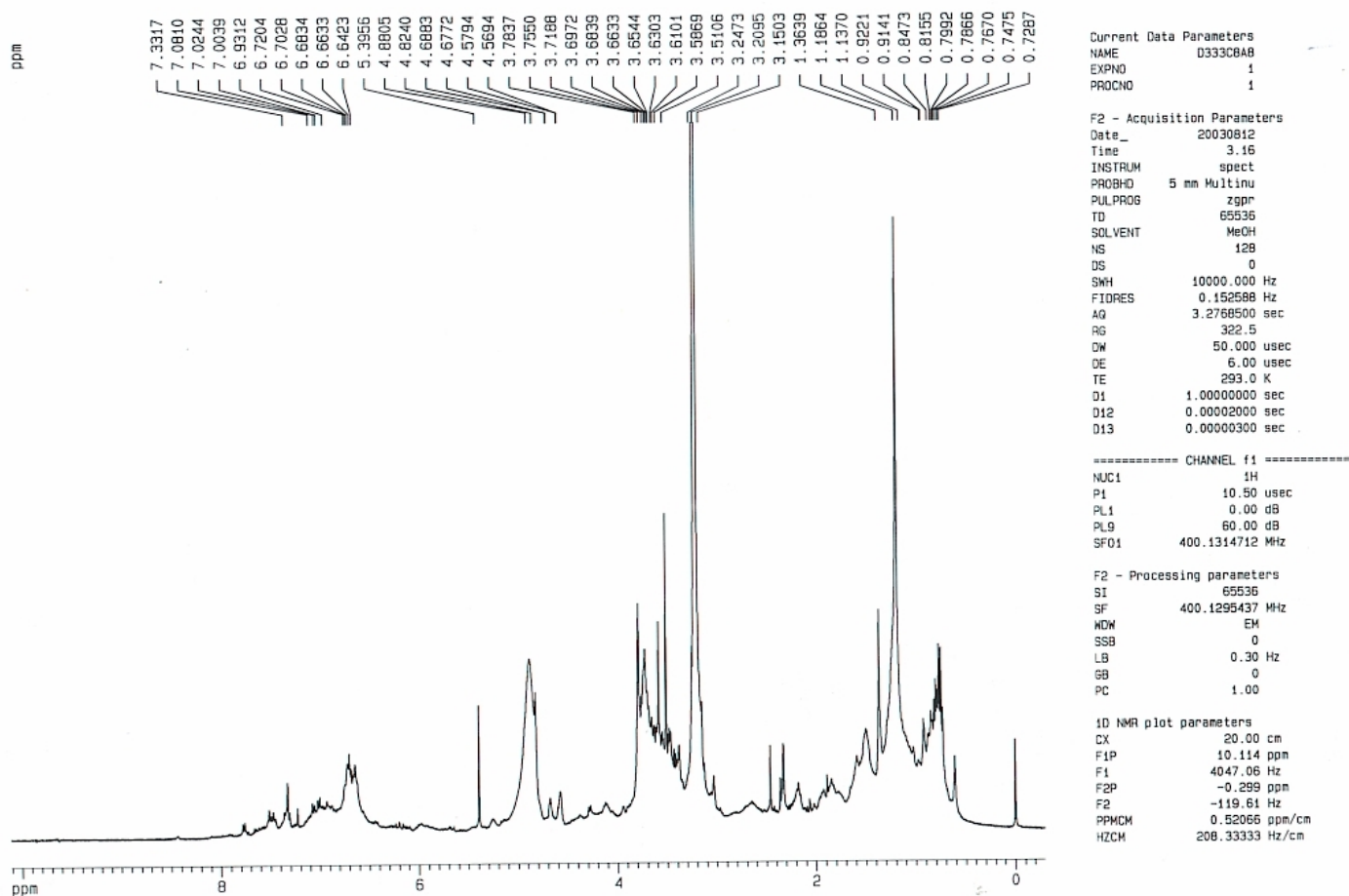


Figura 3.5. Sub-fração B, submetida à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Neste experimento, o deslocamento químico em partes por milhão entre 6,3 e 7,5, sugere que os átomos de hidrogênio que assim se deslocaram, pertencem às moléculas da classe dos taninos.

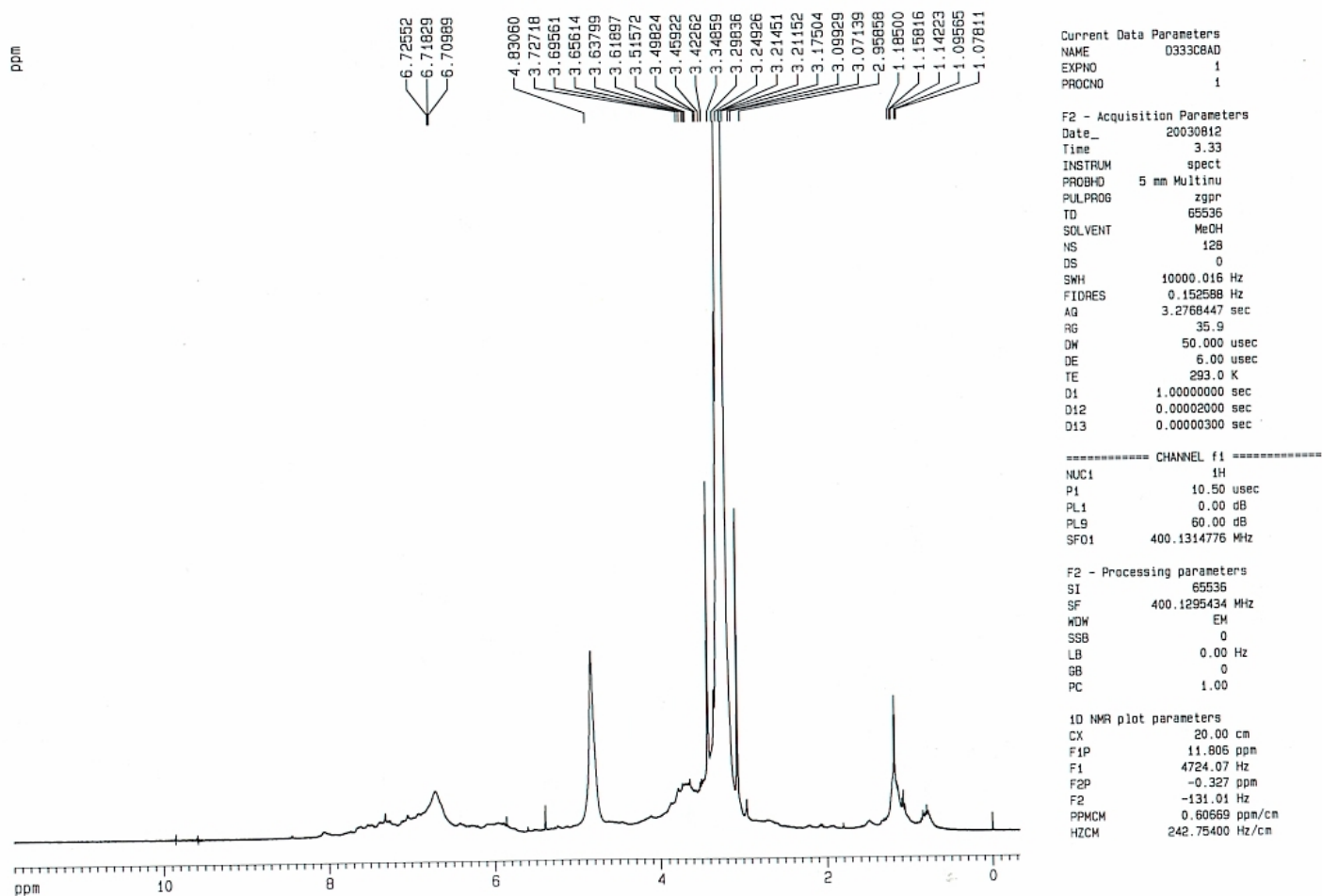


Figura 3.6. Sub-fração D, submetida à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Neste experimento não houve a possibilidade de uma visualização clara do deslocamento químico em partes por milhão das moléculas inibitórias aí presentes.

No presente trabalho, os resultados obtidos sugerem que as moléculas do metabolismo secundário presentes nas folhas de *Andira humilis*, causadoras dos efeitos inibitórios na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de alface, pertencem à classe dos taninos.

Os taninos distribuem-se por todos os tecidos e órgãos da planta, localizam-se nas células vivas, em solução no suco vacuolar sob a forma de combinações complexas ou impregnados nas paredes das células do súber e do lenho (Costa 1972). Da mesma maneira que as ligninas, são encontrados freqüentemente em altas concentrações em todas as classes de plantas vasculares.

Devido à capacidade de ligarem-se a proteínas solúveis e outras macromoléculas, originando complexos insolúveis, os taninos tornam as proteínas e polissacarídeos vegetais indigeríveis, além de diminuir a atividade de enzimas digestivas e microrganismos simbiotes do intestino dos herbívoros. Desse modo, os taninos são compostos secundários do metabolismo vegetal que promovem importante barreira contra o ataque de herbívoros (Swain 1979).

De acordo com a estrutura química, com o peso molecular, com a solubilidade em água e com a ação taninífera, os taninos são divididos em quatro grupos: taninos condensados (proantocianidínicos), taninos hidrolisáveis, oxitaninos e um grupo que reúne vários taninos com características diversas. Dos grupos citados, os taninos condensados são os mais amplamente distribuídos nas plantas vasculares, estando presentes em 62% dos gêneros de dicotiledôneas e em 29% dos gêneros de monocotiledôneas (Swain 1979; Harborne 1993).

Os taninos hidrolisáveis, em sua composição química, contêm ligações ester, que podem ser volatilizadas. Os mais comuns são ésteres glicosilados do ácido gálico ou ácidos gálico e hexahidroxidifênico (Fig. 3.7). O ácido elágico é proveniente do ácido hexahidroxidifênico, o ácido quebulico, é outro produto secundário formado a partir da hidrólise de alguns taninos. Certos taninos hidrolisáveis são misturas complexas de diversos ácidos fenólicos (Robinson 1983; *apud* Rice 1984). Os ácidos digálico e trigálico, em certos casos, são produtos resultantes de leves hidrólises de taninos hidrolisáveis juntamente com o ácido gálico. Existem muitos tipos de moléculas de taninos hidrolisáveis, as quais são identificadas, em geral, com certa dificuldade. São comuns em dicotiledôneas, porém, apenas poucos trabalhos demonstram essas moléculas envolvidas com alelopatia (Bate-Smith and Metcalfe 1957; Swain 1965; *apud* Rice 1984).

Taninos hidrolisáveis já foram identificados em alguns casos como: inibidores do crescimento e da germinação em diversas espécies de frutos secos; agentes que retardam o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio e nitrificantes em *Euphorbia corollata*, *E. supina* e *E. marginata*; inibidores do crescimento de *Rhizobium* de *Rhus copallina*; redutores do crescimento de plântulas de *Carpinus betulus* (Mitin 1970); inibidores da germinação de sementes e do crescimento de plântulas em *Arctostaphylos glandulosa* e redutores da nitrificação produzida por *Quercus marilandica*, *Q. stellata* e *Q. velutina* (Varga & Koves 1959; Rice 1965 a, b; Rice 1969; Blum & Rice 1969; Mitin 1970; Chou & Muller 1972; Rice & Pancholy 1973; *apud* Rice 1984).

Lodhi (1976) *apud* Rice 1984 apontou os ácidos digálico, elágico e gálico como importantes fitotoxinas em solos de florestas do Missouri (EUA), sendo estes compostos os mais persistentes aleloquímicos presentes nestes solos, depois dos ácidos cafeico, ferrúlico, *p*-cumárico e *p*-hidrobenzóico.

Os taninos condensados são formados aparentemente da polimerização oxidativa da catequina e da flavona-3,4-diol (Brown 1964; *apud* Rice 1984). Suas moléculas são parcialmente quebradas apenas por aquecimento drástico causado por ácido concentrado, liberando cloreto de cianidina, o qual, forma uma coloração brilhante avermelhada, e alguns polímeros vermelho-marrons denominados "flobafenos" (Robinson 1983; *apud* Rice 1984).

Esses taninos são citados em poucos trabalhos envolvendo alelopatia. Harris & Burns (1970, 1972); *apud* Rice (1984), relatam que taninos presentes em sementes de determinados híbridos de sorgo, inibem a germinação de sementes. Rice & Pancholy 1973; *apud* Rice (1984) apontam que entre esses taninos anteriormente estudados, foram encontrados apenas taninos condensados.

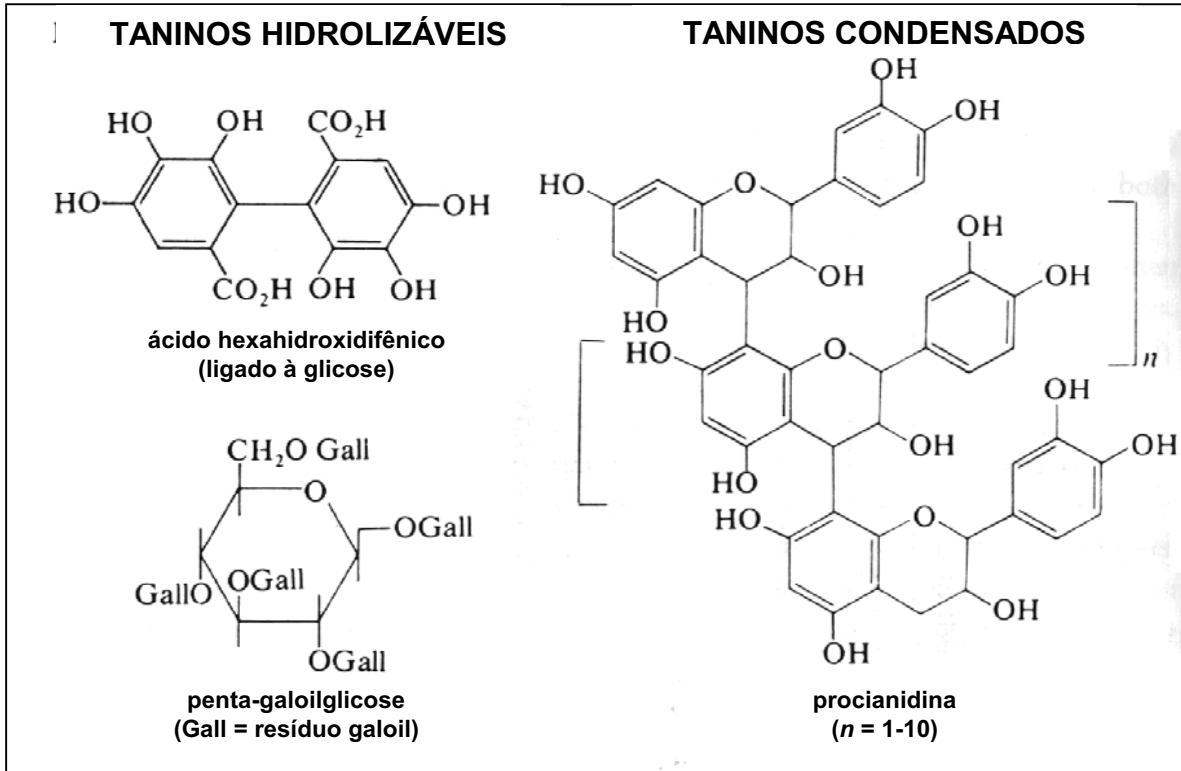


Figura 3.7. Estruturas químicas de taninos encontrados em plantas alelopáticas (Rice 1984).

Conclusão

A análise química dos resultados obtidos sobre a atividade alelopática das folhas de *Andira humilis* permite concluir que a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe dos taninos, seja a principal causa da atividade inibitória ocorrida.

Referências Bibliográficas

- Costa, A. F. 1972. Farmacognosia. v. 3, 4^a edição. **Fundação Calouste Gulbenkian**, Lisboa, 3180p.
- Delachiave, M. E. A.; Rodrigues, J. D. & Ono, E. O. 1999. Efeitos alelopáticos de *Losna* (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.2, pp. 265-269.
- Einhellig, F. A. 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderjit, Dakshini, K. M. N. & Foy, C. L. (eds.). Principles and practices in plant ecology. **Boca Raton**, CRC Press. pp. 479-494.
- Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A. 2000. Alelopátia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Ecofisiologia Vegetal**. 12, edição especial, p. 175-204.
- Fischer, N. H. 1991. In: Harborne, J. B. and Barberan, F. A. T. (eds.). Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. **Clarendon Press, Oxford**. pp. 377-398.
- Gleick, J. 1990. Caos: a criação de uma nova ciência. **Tradução Editora Camou Rio de Janeiro**.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to Ecological Biochemistry. **Academic Press**, London. 382 p.
- Harborne, J.B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. **Academic press limited** – London 318 p.
- Inderjit and Dakshini, K.M.N. 1995. On Laboratory Bioassays in Allelopathy. **The Botanical Review - The New York Botanical Garden**, 61 (1): 28-44.
- Muller, C. H. 1970. Phytotoxins as plant habitat variables. **Recent Advances in Phytochemistry**. 3, pp. 106-121.
- Peres, M. T. L. P.; Pizzolati, M. G.; Queiroz, M. H.; Yunes, R. A. 1998. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (PR). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.33, n.2, p.131-137.
- Pires, N. de M. ; Prates, H. T. ; Pereira F^o, I.A. ; Oliveira Jr, R. S. de ; Faria, T.C.L. 2001. Atividade Alelopática da *Leucena* sobre Espécies de Plantas Daninhas. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 61-65.
- Rizvi, S. J. H.; Haque, H.; Singh, U. K. & Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. 1992. Allelopathy: basic and applied aspects. **Chapman & Hall**, London. p.1-10.
- Swain, T. 1979. Tanins and lignins. In: Rhoades (ed.). Herbivores: their interaction with secondary metabolites. **Academic Press**, New York, 718p.
- Vaccarini, C. E. & Bonetto, G. M. 2000. Selective phytotoxic activity of withanolides from *lochroma australe* to crop and weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n.9.

Considerações Gerais

- Foi possível observar, em condições de laboratório, os efeitos inibitórios que *Andira humilis* e *Anacardium humile* causam na germinação e no crescimento de alface e de rabanete.
- Os efeitos prejudiciais foram evidenciados mais no vigor do que na capacidade germinativa das sementes.
- A velocidade de germinação em sementes de alface e de rabanete foi decrescendo conforme elevou-se a concentração dos extratos aquosos de caules e folhas de *Andira humilis*.
- A capacidade germinativa, em alface, foi afetada apenas na presença do extrato aquoso de caules e folhas de *Andira humilis*. Extratos de caules e folhas de *Anacardium humile* não ocasionam efeitos prejudiciais na mesma.
- O comprimento das plântulas de alface e de rabanete, também mostrou-se como bom parâmetro na verificação das interferências causadas pelos extratos aquosos em diferentes concentrações de caules e folhas de *Andira humilis* e de *Anacardium humile*.
- Não houve estímulo significativo na germinação de sementes e no crescimento de plântulas tanto de alface como de rabanete ocasionado pela atividade dos extratos aquosos em diferentes concentrações de caules e folhas de *Andira humilis* e de *Anacardium humile*.
- A germinação das sementes e o crescimento das plântulas de alface e de rabanete não sofreram influência de fatores físico-químicos dos extratos aquosos de ambas espécies do Cerrado, como, pH e potencial osmótico.
- Os metabólitos secundários com atividade alelopática presentes em folhas de *Andira humilis* têm a propriedade química de alta polaridade, ficando retidos em geral, em solventes mais polares.
- Os efeitos alelopáticos encontrados em folhas de *Andira humilis* são ocasionados pela presença de metabólitos secundários pertencentes à classe dos taninos.