

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

"Atividade fitotóxica de extratos foliares
de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk."

Anabele Stefânia Gomes

Brasília-DF

2013

"Atividade fitotóxica de extratos foliares
de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk."

ANABELE STEFÂNIA GOMES

Orientador: Dr. Fabian Borghetti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília-DF

2012

“O ambiente de trabalho é bom e há muita boa vontade. Não trocaria uma oportunidade dessas pelo melhor laboratório do mundo. Aqui nós vamos produzir pesquisadores capazes, que só não nos superarão se não quiserem, porque vão ter as oportunidades que não tivemos.”

Luiz Fernando Gouvêa Labouriau em entrevista concedida a Isaac Roitman e Luiz Martins referindo-se ao laboratório de Termobiologia (1989).

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais pela base e importância que deram aos meus estudos;

Ao meu marido, por toda compreensão, amor e apoio.

Agradecimentos

Não há como não agradecer primeiramente a Deus, que vem ouvindo minhas preces e tem traçado meu caminho de uma forma perfeita, me colocando nos lugares certos, nas horas certas, além de vir colocando pessoas maravilhosas no meu caminho;

Mais que especial em toda minha vida acadêmica tem sido meus pais, que sempre se esforçaram pra que eu tivesse condições de prosseguir meus estudos, me incentivaram, acreditaram em mim e deixaram que eu escolhesse a carreira que me faz feliz;

Minha irmã, Natália, por simplesmente existir na minha vida e me fazer sentir mais completa, meus esforços são pensando em você também!

Meu amor, minha vida, meu porto seguro, Toni, não há como descrever como seria difícil sem você do meu lado, obrigada por me encorajar e ter paciência nos momentos difíceis.

Meu orientador, professor Fabian Borghetti, que acreditou em mim, que me apresentou o fantástico mundo da alelopatia e que acima de um mestre tem sido um amigo.

À Sarah, que me acolheu desde que cheguei à Termobiologia, me ensinou muito, acreditou em mim e tem me acompanhado e me aconselhado em todos os momentos desde trabalho.

À professora Dâmaris Silveira que me auxiliou diversas vezes, tendo paciência para me ensinar e guiar.

À mais linda equipe que já existiu: Isabele Sena Mendonça, Cibele Carmo da Silva e Nicholas Xavier Giotti, esse trabalho não é meu, é NOSSO! Não tenho palavras pra descrever como vocês foram importantes nessa caminhada. O que posso dizer é que, com certeza, sem vocês eu não conseguiria.

Aos amigos que estiveram comigo na Termobiologia, me ajudando e me fazendo sorrir Laísa Nogueira Allem, Estela Reis de Andrade, Estefânia Dália Hoffman e Leandro Carvalho Ribeiro.

À todos os amigos e companheiros que passaram, ou estão, na Termobiologia Bruno dos Santos Rabelo, Desirée Ramos, Lorena Figueira, Giovanna Caramaschi, Anna Oliveira, Carolina Vieira e Helouise Montandon, de alguma forma vocês têm parte nessa conquista.

Aos meus amigos de Não-Me-Toque (RS), que mesmo longe estavam presentes nessa caminhada.

Ao professor Marcello Moreira, pela compreensão, ensinamentos e amizade.

À D. Odete, minha mãezinha em Brasília, S. Manoel, S. Antônio e S. Francisco, obrigada!

Aos colegas do mestrado, em especial a Juliane Laner Toledo, professores e demais pessoas que de alguma maneira estiveram presentes nessa caminhada.

De coração, obrigada!!!

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	ix
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Metabólitos secundários	1
1.1.1. Rotas dos metabólitos secundários	2
1.1.2. Principais grupos de metabólitos secundários	3
1.1.3. Usos dos metabólitos secundários	7
1.2. Métodos gerais para obtenção de agentes fitotóxicos de plantas.....	11
1.2.1. Coleta.....	12
1.2.2. Extração	12
1.2.3. Métodos de separação, isolamento e identificação.....	13
1.2.4. Testes de bioatividade	14
1.3. Bioma Cerrado e as espécies em estudo.	16
1.3.1. O Bioma Cerrado.....	16
1.3.2. <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk (Sapotaceae).....	16
1.3.3. <i>Sesamum indicum</i> L. (Pedaliaceae)	17
1.3.4. <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (Poaceae)	18
1.4. Referências.....	19
1.5. Objetivos.....	24
1.5.1. Objetivo geral	24
1.5.2. Objetivos específicos	24
2. Capítulo	1.
Época de coleta e do procedimento de extração na atividade fitotóxica de extratos foliares de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk (Sapotaceae) sob a germinação e crescimento de gergelim e braquiária.	25

2.1.	Resumo	26
2.2.	Abstract	27
2.3.	Introdução	28
2.4.	Metodologia	29
2.5.	Referências.....	45
3.	Capítulo	2.
	Avaliação fitotóxica de extratos foliares de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk (Sapotaceae) em <i>Sesamum indicum</i> (gergelim) e <i>Urochloa decumbens</i> (braquiária) e contribuição para a fitoquímica da espécie.....	49
3.1.	Resumo	50
3.2.	Abstract	51
3.3.	Introdução	52
3.4.	Metodologia	53
3.5.	Resultados e Discussão	58
3.6.	Referências.....	75
4.	Anexos.....	79

Lista de Abreviaturas

AcOEt – Acetato de Etila

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CG-EM- Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

EB- Extrato bruto

IC- Intervalo de confiança

T_R – Tempo de retenção

Índice de Figuras

Figura 1. IPP e DMAPP	4
Figura 2. Estrutura do citral e linalol	4
Figura 3. β caroteno, carotenóide.	5
Figura 4. Anel aromático com hidroxila.....	5
Figura 5. Isoflavona, exemplo de um flavonoide	6
Figura 6. Piridina, composto heterocíclico precursor da nicotina	6
Figura 7. Árvore e folhas em destaque de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk.	17
Figura 8. Semente de gergelim, <i>Sesamum indicum</i> L. não germinadas e germinadas... 17	
Figura 9. Sementes, folha e espiguetas de braquiária, <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster.....	18
Figura 10. Rendimento dos extratos aquosos de folhas coletadas em julho e fevereiro, em relação ao peso seco das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk, obtidos por extração a quente e a frio.....	32
Figura 11. Porcentagem de germinação de sementes de <i>Sesamum indicum</i> L. (gergelim) sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$	33
Figura 12. Porcentagem de germinação de sementes de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (braquiária) sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). * Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$	34
Figura 13. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de <i>Sesamum indicum</i> L.(gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$	35
Figura 14. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de <i>Sesamum indicum</i> L. (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência	

dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 36

Figura 15. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 36

Figura 16. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 37

Figura 17. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos de acetato de etila obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 43

Figura 18. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos de acetato de etila obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 43

Figura 19. Bioensaio preliminar: porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante sete dias em soluções obtidas a partir dos extratos brutos de folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk preparados com solventes de diferentes polaridades em sistema de Ultrassom, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$. (Dados Allem et al, 2009)..... 58

Figura 20. Bioensaio preliminar: porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante sete dias em soluções obtidas a partir dos extratos brutos de folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk preparados com solventes de diferentes polaridades em sistema de Ultrassom, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$. (Dados Allem et al, 2009)..... 58

Figura 21. Rendimento dos extratos brutos de hexano, diclometano e acetato de etila pelos métodos de extração com Soxhlet e Ultrassom a partir de folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. 59

Figura 22. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamim indicum* L. (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração de Soxhlet: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 61

Figura 23. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum. indicum* L.(gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração de Soxhlet: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 61

Figura 24. Porcentagem de germinação de sementes de *Sesamum indicum* (gergelim) sob influência do Extrato Bruto (EB) e das frações do extrato de acetato de etila obtido com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), controle (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 62

Figura 25. Porcentagem de germinação de sementes *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) sob influência do Extrato Bruto (EB) e das frações do extrato de acetato de etila obtido com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), controle (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 63

Figura 26. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 64

Figura 27. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.)

Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 65

Figura 28. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 65

Figura 29. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 66

Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 67

Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 67

Figura 32. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ 68

Figura 33. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (braquiária) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$	69
Figura 34. Cromatograma da Fração 1 (F1)	73
Figura 35. Espectro de massa correspondente ao $T_R = 28,12$ min	73
Figura 36. Espectro de massa correspondente ao $T_R = 29,00$ min	73
Figura 37. Estrutura de α e β -amirina.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécie estudada, substância ativa isolada, mecanismo de ação e características principais. Fonte: (Alves <i>et al</i> , 2001b).....	10
Tabela 2. Resultados da análise de variância fatorial de interação entre os fatores época de coleta, tipo de extração e concentração dos extratos de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk para parte aérea (PA) e parte radicular (PR) de <i>Sesamum indicum</i> L. (gergelim). Valores de p menores que 0,05 demonstram interação significativa entre as variáveis.	38
Tabela 3. Interação entre os fatores época de coleta, tipo de extração e concentração dos extratos de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk para parte aérea (PA) e parte radicular (PR) de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Valores de p menores que 0,05 demonstram interação significativa entre as variáveis	39
Tabela 4. Análise dos efeitos da sazonalidade de extratos das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk em plântulas de <i>Sesamum indicum</i> L. (gergelim). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos obtidos pela mesma técnica de extração e em diferentes épocas de coleta. * indica diferença significativa com $p < 0,05$	39
Tabela 5. Análise dos efeitos da sazonalidade de extratos das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk em plântulas de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos obtidos pela mesma técnica de extração e em diferentes épocas de coleta. * indica diferença significativa com $p < 0,05$	39
Tabela 6. Análise dos efeitos dos diferentes métodos extração das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk em plântulas de <i>Sesamum indicum</i> L. (gergelim). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos de folhas coletadas na mesma época e obtidos com diferentes métodos de extração. * indica diferença significativa com $p < 0,05$	41
Tabela 7. Análise dos efeitos dos diferentes métodos extração das folhas de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk em plântulas de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos de folhas coletadas na mesma época e obtidos com diferentes métodos de extração. * indica diferença significativa com $p < 0,05$	41
Tabela 8. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de <i>Sesamum indicum</i> L. sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio.	79

Tabela 9. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio.	79
Tabela 10. Desvio padrão do bioensaio de crescimento de <i>Sesamum indicum</i> L. sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio e do extrato de acetato de etila.	79
Tabela 11. Desvio padrão do bioensaio de crescimento de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio e do extrato de acetato de etila.	79
Tabela 12. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de <i>Sesamum indicum</i> L. sob influência da fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9 (F9) EB (extrato bruto de AcoEt) e Controle (água destilada).	80
Tabela 13. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) R.D. Webster sob influência da fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9 (F9) EB (extrato bruto de AcoEt) e Controle (água destilada).	80

1. Introdução Geral

1.1. Metabólitos secundários

As vias metabólicas dos organismos vivos trabalham prioritariamente em processos que sintetizem compostos orgânicos, essenciais à sua sobrevivência e reprodução, como carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Esses processos demonstram a unidade fundamental de toda a vida e são coletivamente descritos como metabolismo primário (Dewick, 2002). Exemplos de rotas pertencentes ao metabolismo primário é a fotossíntese, a respiração celular, a mitose, a meiose, a síntese proteica, etc. Tais substâncias são amplamente distribuídas e com alto grau de conservação entre os organismos vivos.

Em contraste, nas plantas o metabolismo secundário envolve componentes que tem distribuição mais restrita e menos conservada entre os organismos. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou, popularmente, produtos naturais (Dewick, 2002). A biossíntese desses produtos ocorre em várias organelas celulares, porém estocados em estruturas secretoras especializadas – como ductos, vacúolos, parede celular. Possivelmente a estocagem em tais estruturas seria uma forma de proteger os processos metabólicos da planta produtora caso estes tenham efeitos autotóxico (Souza-Filho & Alves, 2002 c). Em decorrência desse aparecimento descontínuo e diversificado no reino vegetal esses metabólitos podem servir para caracterização de grupos taxonômicos (Taiz & Zeiger, 2004).

Os produtos naturais vinham sendo considerados como resíduos ou subprodutos de rotas metabólicas ou metabólitos clássicos, e por muito tempo não vinham recebendo a devida atenção na ciência. Entretanto, nas últimas três décadas tem se tornado cada vez mais importante o papel que tais substâncias exercem para os organismos vivos. O estudo dos metabólitos secundários deu-se pela sua importância como precursores de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais (Taiz & Zeiger, 2004).

As plantas possuem como característica geral serem sedentárias, estando no mesmo lugar onde ocorreu a germinação, limitando-as de escaparem quando estão sob ameaça. No entanto essa limitação tem sido, em parte, compensada por outros mecanismos de defesa. Tais mecanismos podem ser mecânicos, fenológicos e químicos. Nas defesas mecânicas encontram-se a formação de espinhos, maior dureza das folhas e a presença de tricomas. Entre os mecanismos de defesa fenológicos pode-se citar o ajuste do ciclo biológico para evitar situações de estresse ambiental ou quando os herbívoros estiverem mais ativos. Por último, a defesa

química está representada pelos compostos de origem secundária que atuam em resposta a estresses ocasionados às plantas. Tais compostos são responsáveis pela transmissão de informação das plantas com seu entorno (Oliveros-Bastida, 2008).

Nesse contexto, os produtos estão envolvidos em diversos processos como a defesa contra herbívoros, fungos, bactérias, vírus; como sinalizadores para atração para polinizadores e dispersores de sementes; sinalizadores para comunicação entre plantas e organismos simbiotes e ainda para proteção contra luz ultravioleta (UV) e estresses físicos (Wink, 2010).

Como estimativa, cerca de 100.000 compostos têm sido identificados até o presente. Anualmente 4.000 novos compostos de origem vegetal são relatados, com uma tendência de crescimento para este valor. Entretanto o número real estimado de produtos existentes na natureza pode ser muito maior, pois somente 20-30% das plantas têm sido investigadas pela fitoquímica até agora (Maraschin & Verpoorte, 1999; Wink, 2010).

Embora classificadas como sendo do metabolismo primário ou do secundário, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente uma da outra em um mesmo organismo produtor e muitos metabólitos secundários são formados por sequências de reações análogas àquelas do metabolismo primário (Santos, 2003). A linha divisória entre o metabolismo primário e o secundário é difícil de ser definida e, como exemplo disso, existem aminoácidos que são considerados metabólitos secundários, enquanto muitos esteroides têm um papel estrutural essencial na maioria dos organismos e deveriam, desta maneira, ser considerados metabólitos primários (Alves *et al.*, 2002a).

Contudo, as plantas fornecem uma grande variedade de substâncias bioativas. Essa é a razão para que muitos produtos naturais sejam usados de várias maneiras na biotecnologia, farmácia, medicina e agricultura (Wink, 2010).

1.1.1. Rotas dos metabólitos secundários

Apesar de sua enorme variedade estrutural, os produtos naturais são provenientes de um número restrito de rotas biossintéticas com precursores que normalmente derivam de rotas metabólicas primárias como a glicólise, ciclo de Krebs ou a rota shiquimato (Wink, 2010). Os mais importantes blocos de construção empregados na sua biossíntese são derivados a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), do ácido shiquímico, do ácido mevalônico e do 5-fosfato-1-desoxixilulose (Dewick, 2002).

A acetil-CoA é formada por descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico, produto da via glicolítica. Também é produzida pela β -oxidação de ácidos graxos de forma eficaz invertendo o processo pelo qual os ácidos graxos são eles próprios sintetizados a partir de acetil-CoA.

Importantes metabólitos secundários produzidos a partir da rota do acetato incluem fenóis, juntamente com vários ácidos graxos (Dewick, 2002).

O ácido shiquímico é produzido por uma combinação de um intermediário da via glicolítica, o fosfoenolpiruvato, com o 4-fosfoeritrose, resultante da rota da pentose-fosfato. São derivados da rota shiquimato os aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides (Dewick, 2002).

O ácido mevalônico é formado a partir de três moléculas de acetil-CoA e a desoxixilulose surge a partir de dois intermediários da via glicolítica, o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato. O mevalonato e as vias de fosfato desoxixilulose juntos são responsáveis pela biossíntese de uma vasta gama de terpenóides e esteroides (Dewick, 2002).

É importante ressaltar que os metabólitos secundários podem ser sintetizados através da combinação de vários blocos de construção do mesmo tipo ou diferentes – um único produto natural pode ser produzido a partir da combinação de elementos provenientes das rotas do acetato, shiquimato e fosfato desoxixilulose - assim, expandindo-se a diversidade estrutural (Dewick, 2002). Essa combinação de estruturas pode ter como consequência a dificuldade de herbívoros e micróbios desenvolverem resistência para tais produtos complexos (Wink, 2010).

Além de acetil-CoA, ácido shiquímico, ácido mevalônico e 5-fosfato-1-desoxixilulose outros precursores intermediários da via glicolítica e do ciclo de Krebs são empregados para a síntese de produtos naturais (Dewick, 2002).

1.1.2. Principais grupos de metabólitos secundários

Dos diferentes modos de classificação dos metabólitos secundários neste trabalho optou-se pela classificação em três grandes grupos: terpenoides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, seguindo Taiz & Zeiger, 2004 e Gleason & Chollet, 2012.

1.1.2.1. Terpenóides

Os terpenos constituem o maior grupo de metabólitos secundários, são formados por unidades isoprênicas de cinco carbonos, o pirofosfato de isopentenila (IPP), ou seu isômero, pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Figura 1) (Alves & Santos, 2002; Maraschin & Verpoorte, 1999).

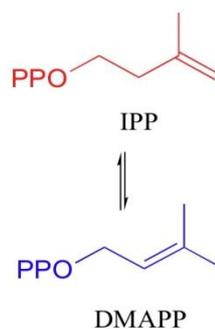


Figura 1. IPP e DMAPP

Os terpenoides são formados a partir via rota do mevalonato e/ou desoxixilulose e seus compostos são classificados de acordo com as combinações entre as unidades de cinco carbonos, com suas várias formas de ciclização (Alves & Santos, 2002; Di Stasi, 1996). Assim, estão classificados em monoterpenos (duas unidades de isopreno ou 10 unidades de carbono), sesquiterpenos (três unidades de isopreno ou 15 unidades de carbono), diterpenos (quatro unidades de isopreno ou 20 unidades de carbono), sesteterpenos (cinco unidades de isopreno ou 25 unidades de carbono), triterpenos (seis unidades de isopreno ou 30 unidades de carbono) e tetraterpenos (oito unidades de isopreno ou 40 unidades de carbono) (Di Stasi, 1996).

Devido à sua característica não-polar e ao baixo ponto de ebulição dos monoterpenos, o grupo tem sido caracterizado por ser constituído por substâncias voláteis. Também possuem baixa solubilidade em água, em comparação a outros produtos naturais mais polares (Alves & Santos, 2002). Os monoterpenos são encontrados nos como óleos essenciais e são muito odoríferos sendo que a produção de essências tem sido uma função fisiológica vital para as plantas. Servem de atrativo para polinizadores ou proteção contra herbivoria (Gleason & Chollet, 2012 a). Entre as substâncias popularmente conhecidas encontradas no grupo pode-se citar citral, linalol (Figura 2) (Di Stasi, 1996).

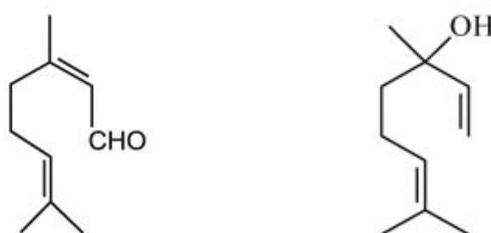


Figura 2. Estrutura do citral e linalol

Quanto aos sesquiterpenos, há uma grande quantidade de compostos devido ao maior número de carbonos e aumento de ciclizações e modificações nas moléculas (Di Stasi, 1996). Juntamente com os monoterpenos os sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas de óleos voláteis (Santos, 2003).

Os triterpenos se caracterizam por sua abundância e grande número de constituintes ativos. Nesse grupo estão incluídos metabólitos de grande importância biológica como o colesterol, a vitamina D e inúmeros esteroides (Di Stasi, 1996). Os terpenos de 40 unidades de carbono representam uma subclasse que inclui a maioria dos carotenoides (Figura 3) (Di Stasi, 1996).

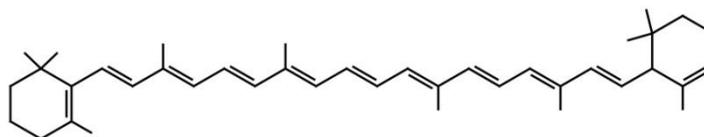


Figura 3. β caroteno, carotenóide.

1.1.2.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos secundários que contêm um anel aromático com ao menos uma hidroxila em sua estrutura (Figura 4). Possuem mais de 10.000 compostos e, devido à sua diversidade química, apresentam uma variedade enorme de funções nos vegetais, como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atrativo para polinizadores, proteção contra radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras (Taiz & Zeiger, 2004). Dentro dos compostos fenólicos destacam-se os flavonoides e os taninos.

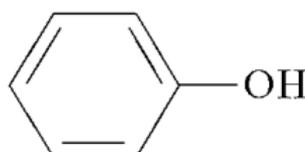


Figura 4. Anel aromático com hidroxila

1.1.2.2.1. Flavonoides

Os flavonoides compreendem uma série de compostos secundários que ocorrem exclusivamente em plantas superiores, tendo como compostos representativos as antocianinas, que em muito contribuem para a coloração nas plantas (Di Stasi, 1996). Eles ainda funcionam, para as plantas, como protetores da luz intensa e radiação UV e podem atuar como antioxidantes (Gleason & Chollet, 2012 b). Possuem uma unidade básica de 15 carbonos (Figura 5).

Comercialmente flavonoides são usados na produção de aromas e sabores de alimentos e bebidas de origem vegetal (Di Stasi, 1996).

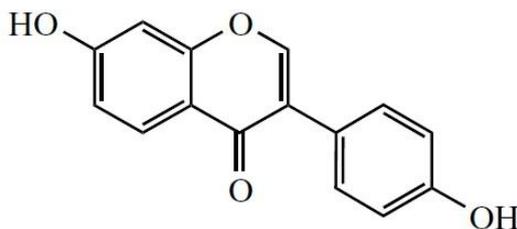


Figura 5. Isoflavona, exemplo de um flavonoide

1.1.2.2.2. Taninos

Os taninos compreendem dois grupos, os hidrolisáveis e os condensados, ambos possuem sabor adstringente. Alguns taninos hidrolisáveis são misturas complexas de vários ácidos fenólicos. Os taninos condensados são encontrados em todas as classes de plantas e os hidrolisáveis são encontrados apenas nas dicotiledôneas (Alves & Santos, 2002). Tanto os taninos hidrolisáveis como os condensados são polifenóis de elevado peso molecular cuja função no organismo produtor está associado com a defesa contra herbivoria (Santos, 2003).

1.1.2.3. Alcaloides

Alcaloides são um grupo heterogêneo de aproximadamente 12 000 compostos conhecidos. São compostos de caráter básico que ocorrem naturalmente, sobretudo no reino vegetal, mas muitos podem ser encontrados em microorganismos, insetos e alguns outros animais, particularmente marinhos (Di Stasi, 1996; Gleason & Chollet, 2012 c). São compostos nitrogenados, sintetizados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos. Como exemplo podemos citar a piridina que é um composto heterocíclico precursor da nicotina (Figura 6).

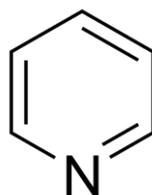


Figura 6. Piridina, composto heterocíclico precursor da nicotina

O esqueleto de um alcaloide pode ser muito complexo, pois para a sua formação contribuem outros precursores, tais como terpenos ou esteroides, tornando difícil a sua localização dentro das principais rotas metabólicas. Para facilitar, os alcaloides costumam ser

classificados de acordo com o sistema de anéis que constituem a principal parte das suas estruturas, os quais, por sua vez, podem ser classificados de acordo com o aminoácido precursor (Santos, 2003). Em decorrência da sua complexidade, a síntese química nem sempre pode ser o modo mais econômico para sua obtenção, podendo assim ser vantajoso à obtenção de alcaloides pela extração em plantas (Gleason & Chollet, 2012 c).

Nas plantas alguns compostos nitrogenados atuam na defesa das plantas contra herbivoria (Taiz & Zeiger, 2004). Por humanos, alguns alcaloides, são mundialmente usados para redução da dor, é o caso da morfina e da codeína.

1.1.3. Usos dos metabólitos secundários

1.1.3.1. Alelopatia e Fitotoxicidade

Algumas espécies de plantas podem ter um efeito fitotóxico contra outras plantas devido à produção de metabólitos secundários. Esses efeitos podem proporcionar vantagens contra plantas concorrentes, concedendo vantagens adaptativas à planta produtora. Dentro desse contexto encontra-se a alelopatia que pode ser descrita, como “todos os processos envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos que influenciam o desenvolvimento natural e sistemas agrícolas” (Sociedade Internacional de Alelopatia, 2012). A alelopatia é um fenômeno puramente natural e ecológico sendo causado por compostos secundários que podem ser lançados ao ambiente por lixiviação, decomposição dos tecidos ou volatilização. Os aleloquímicos podem ser absorvidos por outras plantas, afetando seu padrão de crescimento e/ou diferenciação (Ferreira, 2004). Tais efeitos são manifestações secundárias de efeitos anteriores ocorridos a nível molecular e celular (Ferreira; Áquila, 2000).

Para designar a inibição do crescimento devido a produtos químicos, o termo alelopatia não deve ser utilizado até que haja dados disponíveis sobre (a) libertação natural de compostos a partir da planta agressora, (b) a concentração e persistência destes compostos no meio ambiente, e (c) o envolvimento direto destes compostos com a inibição da planta-alvo (Inderjit *et al*, 2001). Resumidamente o estudo alelopático precisa englobar o mecanismo de liberação do aleloquímico e sua estabilidade no ambiente, o que irá definir os níveis e a forma com que o organismo receptor o absorverá, além dos inúmeros modos de ação encontrados que podem depender de cada receptor (Oliveros-Bastida, 2008). Embora um grande número de bioensaios laboratoriais tenham sido propostos para demonstrar alelopatia, a maior parte deles não englobam os

requisitos supracitados tendo pouca ou nenhuma relevância em termos de comportamento no campo. Assim, para tais estudos a denominação deve ser “estudos fitotóxicos” (Blum, 2011; Inderjit *et al*, 2001).

Para a fitotoxicidade extratos vegetais podem obtidos através de solventes orgânicos, como metanol, acetato de etila e diclorometano, deixando assim de ser um processo que ocorre naturalmente no meio ambiente e então não podendo ser chamado de alelopatia. Estudos com extratos obtidos com solventes orgânicos tem se mostrado bastante eficazes e promissores na descoberta de novas substâncias com potencial fitotóxico.

1.1.3.2. Bioherbicidas

Herbicidas e agroquímicos baseados em produtos naturais são atrativos por uma variedade de razões. Os produtos naturais são frequentemente considerados como não danosos ao meio ambiente, pois muitos desses são facilmente biodegradáveis e como são, pelo menos parcialmente, solúveis em água, facilitando sua absorção pelas plantas, há a possibilidade de serem usados em menores quantidades apresentando menor risco para a rotação de culturas (Alves *et al*, 2002b, Vyvyan, 2002; Huang *et al.*, 2010,).

Outro atrativo é a possibilidade de se aumentar o número de sítios de ação de herbicidas (Dias & Dias, 2007). Esta abordagem não tem sido enfatizada pela indústria agroquímica, embora a possibilidade de descoberta de novos sítios de ação pode ser promissora, uma vez que os produtos naturais tendem a ter modos de ação diferentes dos herbicidas sintéticos (Dayan *et al*, 2000). Os sítios de ação conhecidos de alguns aleloquímicos incluem a divisão e alongamento celular, germinação de pólen, absorção de nutrientes, balanço hormonal, permeabilidade da membrana, fotossíntese e respiração (Souza-Filho & Alves, 2002b; Ferguson & Rathinasabapathi, 2003).

O estudo de mecanismos de ação de fitotoxinas naturais fornece uma via para identificação de mecanismos de ação que se desenvolveram como resultado de interações entre vários organismos e plantas por um longo período de tempo (Dayan *et al*, 2000). Tal estudo é de grande importância, pois com isso haverá a oportunidade de combater/controlar espécies de plantas invasoras que manifestem resistência, ou tolerância aos produtos que hoje estão disponíveis no mercado (Alves *et al*, 2002b).

Obviamente, quaisquer que sejam os novos produtos a serem disponibilizados para o controle de plantas invasoras, devem levar em conta dois aspectos: 1. Ter a mesma eficiência dos

atuais produtos sintéticos disponíveis no mercado; 2. Não produzir os mesmos problemas ambientais e de saúde que os atuais produtos provocam (Alves *et al*, 2002b). No entanto, mesmo sendo produtos naturais é importante a identificação do movimento dos aleloquímicos no solo, seu transporte, absorção, modo de ação, sua interação com outros produtos químicos, meia vida no solo e sua biodegradação (Bhadoria, 2011).

Os aleloquímicos representam numerosos grupos químicos e já foram isolados em mais de 30 famílias de plantas terrestres e aquáticas (Alves *et al*, 2002b). Na Tabela 1 podem-se observar algumas substâncias isoladas de plantas e sua ação:

Tabela 1. Espécie estudada, substância ativa isolada, mecanismo de ação e características principais. Fonte: (Alves *et al*, 2001b).

Espécie	Substância	Ação	Observações
<i>Artemisia spp.</i>	1,8 cineol	Suprime o crescimento de espécies invasoras.	Muito volátil
<i>Agrostemma githago</i>	Agrostemina	Suprime o crescimento de espécies invasoras.	Largamente utilizada em países do Leste Europeu
<i>Ailanthus altissima</i>	Ailantona	Suprime o crescimento de espécies invasoras.	Mais efetiva em uso pós-emergência.
<i>Azadirachta indica</i>	Nimbina, Nimbinina, Azadiraquitinas, Azadironas, Nimo- e-nim-bocinolídeos, Salaninas, etc.	Inseticida e nematocida.	-----
<i>Datura stramonium</i>	Hiosciamina	Herbicida	Tóxica para girassol e vários cereais
<i>Coffea arabica e Canellia sinensis</i>	Cafeína	Herbicida	-----
<i>Secale cereale</i>	Benzoxazinona	Herbicida	Quando transformada por microorganismos do solo a uma diazoperoxido tem atividade aumentada de oito a dez vezes.

Os estudos alelopáticos juntamente com a identificação de aleloquímicos, além de oferecer potencial para o desenvolvimento de modelos de herbicidas, pode prover uma fonte de germoplasma que poderia ser manipulada para aumentar a supressão de ervas daninhas de uma forma ambientalmente correta (Weston, 1996). Assim, compostos isolados das plantas podem ser

usados diretamente ou como modelos moleculares para a síntese de novos agroquímicos, ou ainda, podem ser feitas incorporações de características alelopáticas de plantas silvestres ou cultivadas em outras plantas através de melhoramento genético tradicional ou métodos de engenharia genética que também podem aumentar a síntese e liberação de aleloquímicos por parte da planta de interesse (Ferguson & Rathinasabapathi, 2003; Dias & Dias, 2007).

Embora não se possa descartar o uso de herbicidas sintéticos completamente, um manejo utilizando potencialidades fitotóxicas, pode reduzir seu uso até um ponto que não prejudique a produção agrícola e traga menos danos ao meio ambiente (Bhadoria, 2011). Para isso uma solução viável é a aplicação de compostos alelopáticos antes, concomitantemente, ou após os herbicidas comerciais podendo assim aumentar o efeito geral de ambos os materiais (Ferguson & Rathinasabapathi, 2003).

O estudo de produtos naturais como bioherbicidas torna-se cada vez mais promissor, pois mesmo que o aumento do uso de agrotóxicos tenha proporcionado muitas facilidades ao produtor, isto não pode ser sustentável, especialmente porque a matéria prima não é renovável, além do que, os impactos dos agroquímicos no meio ambiente e na saúde humana em longo prazo ainda são desconhecidos (Soares & Porto, 2007).

Os efeitos tóxicos dos herbicidas comerciais conhecidos na saúde humana vão desde náuseas e vômitos até alguns tipos de cânceres. Quanto ao meio ambiente, podem acumular-se na biota ou contaminar a água e o solo, podendo levar ao desequilíbrio ecológico (Soares & Porto, 2007). A tais problemas acrescenta-se o fato de que alguns indivíduos-alvo adquirem resistência aos herbicidas, o que faz com que as pragas não sejam completamente dizimadas, restando indivíduos com genótipo mais forte (Soares & Porto, 2007).

Com isso, reforçam-se as razões para explorar a alelopatia [ou potencial fitotóxico das plantas] como uma opção alternativa de controle de plantas daninhas (Alves *et al.*, 2002b; Macias *et al.*, 2007).

1.2. Métodos gerais para obtenção de agentes fitotóxicos de plantas

Os estudos químicos de plantas (fitoquímica) estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse, normalmente presente em pequenas quantidades (Ferri, 1996). Pesquisadores têm adaptado os protocolos e desenvolvido suas próprias abordagens levando aos seus objetivos mais efetivamente (Dayan *et al.*, 2000).

1.2.1. Coleta

Na etapa que determina o estudo fitoquímico, escolhe-se a parte da planta que será investigada (raiz, cascas do caule, caule, galhos, folhas, flores, frutos) e a quantidade de material que será coletado (Maciel *et al*, 2002). Muito importante é o registro da época de coleta e condições climáticas que estejam ocorrendo, pois esses podem exercer grande influência sobre a produção de metabólitos vegetais (Falkenberg *et al*, 2003).

Após a coleta, o material deve ser transportado para o laboratório e ser seco o quanto antes possível a 40-60°C, com ventilação forçada (Ferri,1996). A secagem tem a finalidade de retirar a água do material de estudo, com isso impedindo a hidrólise e o crescimento microbiano (Falkenberg *et al*, 2003). Se o material não for usado imediatamente seu armazenamento deve ser feito em baixa umidade e temperatura (Maciel *et al*, 2002).

Antes da extração o material deve ser triturado, pois o aumento da área de contato entre o material sólido e o líquido torna mais eficiente a operação, ainda, quanto mais rígido forem os tecidos vegetais, maior será o grau de divisão necessário (Ferri,1996; Falkenberg *et al*, 2003).

1.2.2. Extração

A extração de aleloquímicos é uma parte muito importante dos bioensaios, a escolha do método de extração vai depender da textura do material, do conteúdo de água presente e do tipo de substâncias que se deseja isolar (Inderjit & Dakshini, 1995; Ferri,1996).

Entre os métodos comuns de extração tem-se a extração feita pelo sistema de Soxhlet onde o solvente é renovado e o extrato fica submetido a temperaturas elevadas. Há, ainda, a percolação, um método de extração a frio, que requerer maior volume de solvente, porém tem o benefício de apresentar menor risco de reações químicas por não envolver altas temperaturas que podem degradar ou desnaturar algum produto ativo (Ferri,1996; Maciel *et al*, 2002).

Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar (metanol ou etanol); para mais de uma extração utiliza-se pelo menos três tipos de solventes: apolar (hexano ou éter de petróleo), de polaridade moderada (clorofórmio ou diclorometano) e polar (metanol ou etanol) (Maciel *et al*, 2002). Uma das razões para que se faça a extração com mais de um tipo de solvente é que as plantas produzem um sem-número de metabólitos com diferentes polaridades e que podem ter atividade fitotóxica, alguns podem ser baixa polaridade, outras de média e, finalmente, metabólitos de alta polaridade (Souza-Filho *et al*, 2010).

Quanto ao tempo de extração, pode variar em função da rigidez dos tecidos do material vegetal e do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente e do emprego – ou não – de temperatura e/ou agitação (Falkenberg *et al*, 2003). Para prevenir qualquer perda de material, todos os extratos devem ser estocados em baixa temperatura (Ferri,1996).

1.2.3. Métodos de separação, isolamento e identificação.

A identificação dos aleloquímicos não é uma tarefa simples, pois geralmente os metabólitos ativos são encontrados em extratos de plantas e exudados de raízes. Além disso, os perfis de metabólitos secundários diferem em qualidade e quantidade, dependendo de vários fatores, incluindo as condições meteorológicas, a idade da planta e os métodos de extração e análise (Macias *et al.*, 2007).

A separação e a purificação dos constituintes químicos de plantas são efetuadas utilizando uma ou mais técnicas cromatográficas. Quando dois ou mais compostos estão em misturas e devem ser separados fisicamente utilizam-se técnicas de duas fases: (a) uma fase estacionária, que pode ser um sólido ou um líquido suportado sobre um sólido; (b) uma fase móvel, um gás ou um líquido que flui continuamente pela fase estacionária. A separação depende primeiramente das diferentes afinidades com a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos componentes individuais (Ferri,1996). Separações cromatográficas em que a fase móvel é apolar e a fase estacionária é polar são denominadas separações de fase normal, enquanto sistemas com fase móvel polar e fase estacionária apolar constituem separações em fase reversa (Falkenberg *et al*, 2003).

A cromatografia líquida em coluna é uma das técnicas mais utilizadas para a separação ou isolamento dos constituintes de extratos vegetais, sendo bastante versátil podendo-se usar colunas de diferentes tipos e dimensões, bem como diversas combinações de fases móveis e estacionárias (Falkenberg *et al*, 2003).

Na cromatografia em papel a fase móvel depende da natureza das substâncias a serem separadas. Após o desenvolvimento, o solvente é evaporado e os compostos separados são detectados por meios de métodos químicos e físicos. O papel é imerso ou borrifado com um reagente químico que em reação com os produtos presentes pode produzir cor, e a partir de tais colorações pode ser possível à identificação dos grupos químicos a que os produtos pertencem. Para este fim existe uma série de reagentes de revelação para diversas classes de compostos. A

revelação dos componentes químicos presentes em misturas pode-se efetuar por meio da utilização de radiação ultravioleta (Ferri,1996).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (Falkenberg *et al*, 2003). A separação de componentes de uma mistura acontece através de migração diferencial sobre uma camada adsorvente retido sobre uma superfície plana, geralmente vidro, alumínio ou plástico. Como na CCD os adsorventes são quimicamente inertes, podem-se utilizar reveladores altamente reativos e a revelação pode ser por aquecimento, diferenciando da cromatografia em papel (Ferri,1996). Semelhante à cromatografia em coluna, pode-se escolher entre dezenas de tipos de suportes, tanto na fase normal como na reversa, dependendo da polaridade dos componentes da amostra a analisar (Falkenberg *et al*, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica cromatográfica muito poderosa e versátil para a separação de produtos naturais, necessitando um tempo relativamente curto para seu desenvolvimento e apresentando alta resolução (Ferri,1996; Wolfender, 2009). A CLAE utiliza colunas com fase estacionária formada por partículas extremamente finas (3 a 10 µm), esféricas ou irregulares, homogêneas e densamente compactadas, oferecendo grande resistência ao fluxo da fase móvel o que requer alta pressão (Falkenberg *et al*, 2003).

A cromatografia gasosa (CG) utiliza reações químicas com derivados de silano, por meio da coluna, e é possível seu acoplamento a um sistema de espectrômetro de massa combinando as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). A CG-EM é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas relativamente elevadas empregadas durante o processo de separação cromatográfica (Falkenberg *et al*, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

O espectro de massas de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. A massa molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença e a localização de certos grupos funcionais (Falkenberg *et al*, 2003).

1.2.4. Testes de bioatividade

Os bioensaios de bioatividade devem ser rápidos, de fácil operação, ter aplicação ampla

para numerosas espécies-alvo, ser reproduzíveis e estatisticamente válidos (Wu *et al* 2001). Os testes de bioatividade devem ser biodirecionados e são recomendados desde a obtenção do extrato bruto, sendo repetido com as frações obtidas da cromatografia e com os produtos isolados, constatando-se assim se o efeito é causado por sinergismo ou por um único agente fitotóxico. A germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento, por isso recomenda-se que se façam bioensaios separadamente, avaliando os efeitos tanto na germinação como no desenvolvimento das plântulas (Ferreira, 2004).

Os testes de germinação são simples, no entanto há uma série de cuidados que devem ser tomados para que se possam ter respostas reproduzíveis (Ferreira, 2004). Habitualmente os experimentos são conduzidos em câmaras de germinação, em condições controladas de temperatura e luz, com duração de tempo variável, normalmente entre sete e 10 dias, em determinados casos, a temperatura é contínua e, em outros, alternada com tempo de duração para claro/escuro bem variado, dependendo das exigências da espécie receptora (Souza-Filho *et al*, 2010). Normalmente são avaliados o índice de velocidade de germinação e a germinabilidade das espécies-alvo. A germinação deve ser verificada diariamente ou em intervalos menores para contabilizar as sementes germinadas. O critério pode ser o aparecimento da curvatura geotrópica da radícula ou o seu tamanho ser no mínimo 50% do tamanho da semente para evitar a falsa germinação por expansão do embrião com a embebição (Ferreira, 2004).

Em testes de desenvolvimento inicial preferencialmente as sementes devem ser colocadas para germinar previamente as em água destilada, após a constatação da germinação as plântulas são transferidas para a solução-teste (Souza-Filho *et al*, 2010). Quando se deseja que o bioensaio seja rápido, implica-se que as espécies vegetais selecionadas devam germinar facilmente e uniformemente e ainda crescer de forma relativamente rápida. A espécie mais utilizada como planta indicadora é a alface (*Lactuca sativa*) (Dayan *et al*, 2000; Souza-Filho *et al*, 2010). Isso se dá ao pequeno período requerido para a sua germinação (24 a 48 horas) e para seu crescimento (Ferreira, 2004). Por outro lado, ela é extremamente sensível aos efeitos tanto de extratos brutos como de aleloquímico podendo superestimar a atividade fitotóxica. Esse problema é especialmente crucial quando se tem na alface a única espécie receptora (Souza-Filho *et al*, 2010).

Inderjit & Weston (2000), aconselham que se evite o uso de espécies-alvo sensíveis e que os extratos sejam testados em mais de uma espécie. O uso de mais de uma espécie permite melhor dimensionamento das reais potencialidades fitotóxicas das espécies doadoras além de possibilitar inferências mais amplas e mais próximas da realidade (Souza-Filho *et al*, 2010).

É interessante que mais de uma concentração do extrato seja testada, sendo recomendado estabelecer uma dose-resposta de pelo menos três níveis de concentração, para que se obtenha dados confiáveis (Inderjit; Weston, 2000). E que ainda, a concentração não seja demasiadamente elevada, o que levaria a um potencial fitotóxico da planta doadora que na realidade não existe ou é inexpressiva (Souza-Filho *et al*, 2010).

1.3. Bioma Cerrado e as espécies em estudo.

1.3.1. O Bioma Cerrado

O Cerrado caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos, um clima classificado predominantemente como Aw de Koppen (tropical chuvoso). Possui média anual de precipitação na ordem de 1.500 mm, sendo que as chuvas são praticamente concentradas de outubro a março. A temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C (Ribeiro & Walter, 2008). De maneira geral, os solos das diferentes fitofisionomias do Cerrado são álicos (com altos teores de Al). O tipo de solo predominante do Bioma são os Latossolos, abrangendo aproximadamente 48% do território. Esse tipo de solo é caracterizado por ser profundo, distrófico e ácido, de baixa a média capacidade de troca catiônica, sendo assim, tem escassez de nutrientes (Reatto *et al*, 2008). As condições ambientais do bioma Cerrado, que sofre com seca, com solo pobre em nutrientes e rico em alumínio, são considerados como estimulantes para a produção dos metabólitos secundários pelas plantas, elevando a diversidade química do cerrado (Espíndola-Darvenne, 2007).

1.3.2. *Pouteria torta* (Mart.) Radlk (Sapotaceae)

A espécie ocorre no cerrado sentido restrito, campos e cerradão, no DF e estados BA, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PI e RO. Constitui-se de uma espécie arbórea semidecídua e tem nome popular grão-de-galo (Silva-Júnior, 2005). As plantas desse gênero têm sido utilizadas na construção civil, na alimentação e também na medicina popular. Algumas atividades são reportadas às espécies desse gênero, tais como, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (Silva *et al*, 2009).

Ao observar-se a *P. torta* (Figura 7) no Cerrado, constata-se uma grande quantidade de liteira abaixo da copa, e muito poucas herbáceas estabelecem-se no solo abaixo destas árvores, podendo indicar potencial alelopático da espécie. Testando sua fitotoxicidade, extratos aquosos

de *P. torta* inibiram o crescimento inicial de gergelim e alface e extratos etanólicos de *P. caimito* e *P. ramiflora* apresentaram atividade fitotóxica na germinabilidade de sementes de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum* (Nascimento *et al*, 2007; Guimarães *et al*, 2008; Condessa, 2011). Em testes de atividade microbiana, extratos hexânico e etanólico da folha de *P. torta* apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e além desse, o extrato aquoso mostrou-se ativo contra *Pseudomonas aeruginosa* (López, 2005). Estudos químicos de alguns extratos oriundos do caule, folhas e cascas de *P. venosa* mostraram resultados preliminares positivos frente a ensaios antimaláricos *in vivo* e com larvas de *Aedes aegypti*, além do isolamento de quatro triterpenos (taraxerol, ácido ursólico, ácido 3 β ,19 α ,23-triidroxiurs-12-en-28-óico e ácido 2 α ,3 α ,19 α ,23-tetraidroxiurs-12-en-28-óico) e um fitoesteróide (espinasterol) (Montenegro *et al*, 2006).

Quanto à identificação de metabólitos secundários no gênero, triterpenos e flavonóides têm sido encontrados como principais componentes. Normalmente, os triterpenos isolados têm sido ésteres de cadeia longa ou acetato (Silva *et al*, 2009).



Figura 7. Árvore e folhas em destaque de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

1.3.3. *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae)

O gergelim é uma espécie-alvo comumente usada em estudos alelopáticos e fitotóxicos por possuir alta velocidade de germinação, ser de fácil aquisição e possuir amplo espectro germinativo quanto à temperatura (Figura 8) (Carvalho *et al*, 2001).



Figura 8. Semente de gergelim, *Sesamum indicum* L. não germinadas e germinadas.

1.3.4. *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Poaceae)

No Brasil, várias espécies de gramíneas de origem africana foram introduzidas acidentalmente ou para fins forrageiros, tornando-se invasoras de ecossistemas naturais, principalmente dos ambientes abertos, como campos e cerrados. Uma vez introduzidas no Brasil, essas gramíneas encontraram no cerrado condições ecológicas semelhantes às de seus habitats de origem, as savanas africanas, o que facilitou sua disseminação (Freitas & Pivello, 2005).

A braquiária é uma dessas espécies que escapou ao cultivo e passou a infestar lavouras anuais e perenes, além disto, esta invasora promove severa dificuldade de regeneração natural da vegetação nativa, pelo fato de dificultar muito a germinação de espécies nativas (Figura 9) (Instituto Horus, 2005; Lorenzi, 2000). Vários estudos têm mostrado que a invasão por espécies exóticas pode afetar a estrutura das comunidades de plantas e animais, a ciclagem de nutrientes, a produtividade, a hidrologia e o regime de fogo. As gramíneas exóticas invasoras são extremamente agressivas e competem com sucesso com a flora nativa. São capazes de invadir áreas naturais com sucesso e de descaracterizar em poucos anos a fisionomia da vegetação original (Martins *et al*, 2007).



Figura 9. Sementes, folha e espiguetas de braquiária, *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster.

1.4. Referências

ALVES, S.M. & SANTOS, L.S. 2002. Natureza química dos agentes alelopáticos. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais.* Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 25-47.

ALVES, S.M.; ARRUDA, M.S.P.; SOUZA FILHO, A.P.S. 2002 a. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais.* Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 79-109.

ALVES, S.M.; MULLER, A.H.; SOUZA FILHO, A.P.S. 2002 b. Alelopatia e a produção de defensivos agrícolas. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais.* Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 205-260.

BHADORIA, P.B.S. 2011. Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management. *American Journal of Experimental Agriculture* 1(1): 7-20.

BLUM, O. 2011. Plant–Plant Allelopathic Interaction. Phase II: Field/Laboratory Experiments. *In: BLUM, O. Plant–Plant Allelopathic Interaction: North Carolina State University: Springer.*p. 86-149.

CARVALHO, P.G.B.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M.S.; MORHY, L.; FERREIRA-FILHO, E.X.F. 2001. Temperature-dependent germination and endo-b-manase activity in sesame seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (2): 139-148.

CHIARADIA, C.M., COLLINS, H.C., JARDIM, F.S.C.I. 2008. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova* (31)3:623-636.

CONDESSA, B. M. 2011. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 101p.

DAYAN, E.F.; ROMAGNI, G.J. and DUKE, O. S. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* (26)9: 2079-2094.

DEWICK, M. P. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 Ed. John Wiley & Sons Ltd. 2002.

DI STASI, C.L. 1996. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. *In: DI*

STASI, C.L (Org.). *Plantas medicinais: Arte e Ciência*. São Paulo: Editora UNESP. 1996. p. 108-127.

DIAS, L.S.; DIAS, A.S. 2007. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. *Rev. de Ciências Agrárias* (30)1: 510-517.

ESPÍNDOLA-DARVENNE, L. S. 2007. Cerrado, fonte de descoberta de novos medicamentos. *Brasilia Médica*. (44)3: 193-198.

FALKENBERG, B. M., SANTOS, I., SIMÕES, O.M. 2003. Introdução da análise fitoquímica. In: SIMÕES, O. M. C. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2003. p.229-244.

FERGUSON, J.J. RATHINASABAPATHI, B. 2003. Allelopathy : How Plants Suppress Other Plants. University of Florida, IFAS *Extension*. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/hs186>. Acesso em: 25 abr 2011.

FERREIRA, A.G. 2004. Interferência, competição e alelopatia. In: FERREIRA, A.G & BORGHETTI, F. (eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. p.251-262.

FERREIRA, A.G & ÁQUILA, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (especial)175-204.

FERRI, H. P., 1996. Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: STASI, C. L., (Eds). *Plantas Medicinais: Arte e Ciência*. São Paulo: Editora Unesp. 1996. p.129-156.

FREITAS, G.K.; PIVELLO, V.R. A ameaça das gramíneas exóticas à biodiversidade. In: PIVELLO, V.R.; VARANDA, E.M. (Ed.). *O cerrado Pé-de-Gigante: ecologia e conservação - Parque Estadual de Vassununga*. São Paulo: Secretaria de Meio Ambiente, 2005. p. 240-270.

GLEASON, K.F. CHOLLET, R. 2012 a. Isoprenoid compounds (Terpenes). In: GLEASON, K.F. CHOLLET, R. *Plant Biochemistry*. 1ed. Jones & Bartlett Learning. 2012. p. 100-118.

GLEASON, K.F. CHOLLET, R. 2012 b. Aromatic and phenolic compounds. In: GLEASON, K.F. CHOLLET, R. *Plant Biochemistry*. 1ed. Jones & Bartlett Learning. 2012. p. 119-148.

GLEASON, K.F. CHOLLET, R. 2012 c. Alkaloids. In: GLEASON, K.F. CHOLLET, R. *Plant Biochemistry*. 1ed. Jones & Bartlett Learning. 2012. p. 149-166.

GUIMARÃES, E. S. L., MOTTA, M.C.F., BORGHETTI, F. 2008. Efeitos alelopáticos de folhas inteiras e trituradas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk sobre o desenvolvimento inicial de *Sesamun indicum* L. IX Simpósio Nacional Cerrado.

- HUANG, H., MORGAN, C. M., ASOLKAR, R. N., Marja E KOIVUNEN, M. E., MARRONE, P.G.2010. Phytotoxicity of sarmentine isolated from long pepper (*Piper longum*) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* (58)18:9994-10000.
- INDERJIT and DAKSHINI, K.M.M.1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review* (61)1:28-44
- INDERJIT and WESTON, A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal of Chemical Ecology* (26)9: 2111-2118.
- INDERJIT, OLOFSDOTTER, M., STREIBIG, J.C. 2001. Laboratory bioassay for phytotoxicity: an example from wheat straw. *Agronomy Journal* 93: 43-48.
- INSTITUTO HORUS. 2005. *Brachiaria decumbens*. Disponível em: http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Brachiaria_decumbens.htm. Acesso em: 21 maio 2011.
- LÓPEZ, S. E. K. 2005. Estudo químico e atividade biológica de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk (Sapotaceae). Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 89 p.
- LORENZI, H., Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2000.
- MACIAS, F.A., MOLINILLO, J.M.G.,VARELA, R.M., GALINDO, J.C.G. 2007. Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*. 63: 327-348.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, C.A., VEIGA JR, F.V., GRYNBERG, F.N., ECHEVARRIA, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* (25)3:429-438.
- MARASCHIN, M. VERPOORTE, R. 1999. Engenharia do Metabolismo Secundário. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*.(2)10: 24-28.
- MARTINS, C. R., HAY, J. D., VALLS, M.F.J., LEITE L.L., HENRIQUES, R. P. B. 2007. Levantamento das gramíneas exóticas do Parque Nacional de Brasília, Distrito Federal. *Natureza & Conservação*, v. 5, p. 23-3
- MONTENEGRO, M.H.L., OLIVEIRA, S.E.P, CONSERVA, M.L., ROCHA, M.M.E, BRITO, C.A., ARAÚJO, M.C., TREVISAN, S.T.M., LEMOS, L.P.R. 2006. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(Supl.): 611-617.

NASCIMENTO, M.C., ALCANTARA S.F., HADDAD, C.R.B., MARTINS, F.R. 2007. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. *Allelopathy Journal* (20)2: 279-286.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. J. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Quimica Viva*. (7)1:2-34.

REATTO, A; CORREIA, R.J.; SPERA, T.S.; MARTINS, S.E.(2008) Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos. *In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. de & Ribeiro, J.F. (Eds.). Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 108-149.*

RIBEIRO, J.F. WALTER, B.M.T. (2008) As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. *In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. de & Ribeiro, J.F. (Eds.). Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 151-212*

SANTOS, S.I. 2003. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In: SIMÕES, O. M. C. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2003. p.403-434*

SILVA, C.A.M., SIMEONI, L.A., SILVEIRA, D. 2009. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2A): 501-509.

SILVA JÚNIOR, M.C. 2005. *100 árvores do Cerrado-Guia de campo*. Rede de Sementes do Cerrado. 278 p.

SOARES, L. W., PORTO, F. M. 2007. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. *Ciência e Saúde Coletiva*. (12) 1: 131-143.

Sociedade Internacional de Alelopatia. 2012. Disponível em: <http://www.international-allelopathy-society.org>. Acesso em: 21 out 2012

SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M. 2002a. Mecanismo de liberação e comportamento de aleloquímicos no ambiente. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 111-129.

SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M. 2002b. Mecanismo de ação dos agentes alelopáticos. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 131-154.

SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M. 2002c. Função dos agentes alelopáticos em plantas. *In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 49-78.

SOUZA FILHO, A.P.S., GUILHON, G.M.S.P., SANTOS, L.S. 2010. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. *Planta Daninha* (28)3:689-697.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3. Ed. São Paulo: Artmed. 2004.

VYVYAN, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58: 1631-1646.

WESTON, A.L. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal* 88: 860-866.

WINK, W. 2010. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *In*: WINK, W. Biochemistry of plant secondary metabolism. 2Ed. John Wiley & Sons Ltd. 2010. p. 1-19.

WOLFENDER, L. J. 2009. CLAE in natural product analysis: the detection issue. *Planta medica* (7) 75:719-734.

WU, H., PRATLEY, D., LEMERLE, D., HAIG, T., AN, M. 2001. Screening methods for evaluation of crop allelopathic potential. *The Botanical Review* (67)3:403-415.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo geral

- Realizar estudos de fitotoxicidade de tecidos foliares de *Pouteria torta* e buscar moléculas que apresentem bioatividade contra o desenvolvimento e diferenciação de *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária).

1.5.2. Objetivos específicos

- Testar diferentes métodos de extração de princípios ativos dos tecidos foliares de *P. torta*.
- Verificar se há efeito sazonal na quantidade e atividade de moléculas bioativas nos tecidos foliares de *P. torta*.
- Fracionar extratos foliares por grau de polaridade e identificar frações ativas por meio de bioensaios monitorados com *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária);
- Identificar os grupos funcionais dos quais pertencem às moléculas predominantes nas frações ativas.
- Contribuir no estudo fitoquímico de *P. torta*.

2. Capítulo 1.

Época de coleta e do procedimento de extração na atividade fitotóxica de extratos foliares de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) sob a germinação e crescimento de gergelim e braquiária.

2.1. Resumo

Muitos metabólitos secundários podem ser sintetizados desde os primeiros estágios da planta, no entanto outros podem ter sua produção desencadeada ou aumentada em resposta a algum estímulo ambiental, o que pode afetar seu potencial fitotóxico. O método de extração e o tipo de solvente utilizado para tal podem interferir na estrutura de produtos e na quantidade a ser extraída. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas de *P. torta* coletadas na estação chuvosa e na estação seca no Cerrado, e obtidos por extração a quente e a frio, nas espécies alvo *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária). Ainda, comparar a atividade dos extratos aquosos com extratos obtidos por acetato de etila. Os extratos foram testados em cinco concentrações, 200, 400, 800, 1600 e 3200 ppm. Foram realizados experimentos de germinação e crescimento inicial em placa de petri que foram mantidas em câmara de germinação por sete dias, a 30°C, com fotoperíodo de 12h. Não houve diferença na atividade em relação à época de coleta ou ao método de extração. Em relação ao extrato obtido por acetato de etila, a extração aquosa mostrou-se mais indicada para obtenção de fitoquímicos na espécie estudada, por ter maior efeito inibitório sob as espécies-alvo, além de ter baixo custo. A germinabilidade e o tempo médio de germinação não foram alterados em nenhuma das espécies, no entanto, o crescimento inicial foi inibido. O crescimento radicular foi mais sensível aos efeitos dos fitoquímicos que o crescimento aéreo. O gergelim mostrou-se mais sensível aos tratamentos do que a braquiária.

Palavras chave: Potencial fitotóxico, época de coleta, método de extração.

2.2. Abstract

Many secondary metabolites can be synthesized since the earliest stages of plants life, however, others may have their production initiated or increased in response to an environmental stress, which can affect their phytotoxic potential. The method of extraction and the solvent used may interfere with the structure of products and quantity to be extracted. The aim of this study is to evaluate phytotoxic potential of aqueous extracts from leaves of *P. Torta*, collected during the rainy and the dry season in Cerrado, obtained by hot and cold extractions, using as the target species *Sesamum indicum* and *Urochloa decumbens*. Also, to compare the activity of aqueous extracts with the extracts obtained by ethyl acetate. The extracts were tested at five different concentrations: 200, 400, 800, 1600 and 3200 ppm. Germination and early growth experiments were tested in Petri dish, which were kept in growth chamber for seven days, at 30°C, with a 12h photoperiod. There was no difference in the activity concerning to time of collection or method of extraction. Regarding the extract obtained by ethyl acetate, the aqueous extraction was more suitable for obtaining phytochemicals from the studied specie, because of greater inhibitory effect on target species and low cost. Germinability and the mean time to germination were not altered in any target species, however, early growth was inhibited. Root growth was more sensitive to effects of phytochemical than to aerial growth. The sesame was more sensitive to the treatments than brachiaria.

Key words: phytotoxic potential, method of extraction, time of collection

2.3. Introdução

Alguns fatores ecológicos podem influenciar direta ou indiretamente a produção de metabólitos secundários, entre eles o efeito da radiação UV, luz infravermelha, deficiência de minerais, estresse hídrico e temperaturas extremas. Ainda, estresses ambientais podem ser provenientes de patógenos, herbivoria, pesticidas ou ação de diferentes poluentes (Alves *et al*, 2002; Einhelling, 2004). Muitas dessas substâncias são sintetizadas desde os primeiros estágios de crescimento das plantas, ou sua produção pode ser desencadeada por algum estímulo externo, assim, a época ou estação do ano gerando condições ambientais diferentes, podem afetar a produção de metabólitos secundários (Alves *et al*, 2002; Einhelling, 2004; Oliveros-Bastida, 2008).

A extração de aleloquímicos é uma parte muito importante dos bioensaios, a escolha do método de extração vai depender da textura do material, do conteúdo de água presente e do tipo de substâncias que se deseja isolar (Ferri, 1996; Inderjit & Dakshini, 1995). Deve-se ter cuidado na escolha do solvente e do método de extração, pois é graças a essa seletividade que poderá se extrair apenas as substâncias desejadas ou estas em maior quantidade (Falkenberg *et al*, 2003; Inderjit & Dakshini, 1995). O aumento da temperatura, para extração, pode ser um agente facilitador pois provoca um aumento da solubilidade em qualquer substância, entretanto pode provocar reações químicas, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas. (Falkenberg *et al*, 2003)

A água é utilizada na extração de substâncias hidrofílicas, como aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, saponinas e mucilagens sendo um dos líquidos extratores mais importantes (Sonaglio *et al*, 2003). Essa metodologia é encontrada em diversos estudos no Brasil (Jacobi & Ferreira, 1991; Santos *et al*, 2002; Oliveira *et al*, 2004; Periotto *et al*, 2004; Maraschin-Silva & Áquila, 2006; Carmo *et al*, 2007; Sartor *et al*, 2009) e no exterior (Barnes & Putnam, 1986; Chou & Kuo, 1986; Yu *et al*, 2003; Morgan & Overholt, 2005;).

Os solos do Cerrado são pobres em nutrientes, em conjunto uma longa estação seca e queimadas frequentes são fatores de estresse podem exigir adaptações para facilitar a vida das plantas nesse bioma (Haridasan, 2000; Marquis *et al*, 2002;). Como exemplos das adaptações adquiridas pelas espécies do cerrado estão às folhas coriáceas e a elevada produção de compostos fenólicos e nitrogenados (Marquis *et al*, 2002).

Pouteria torta (Mart.) Radlk, pertencente à família Sapotaceae, constitui-se de uma espécie arbórea semidecídua e ocorre no cerrado sentido restrito, campos e cerradão, no DF e estados BA, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PI e RO (Silva-Júnior, 2005). Ao observar-se a *P.*

torta no Cerrado, constata-se uma grande quantidade de liteira abaixo da copa, e muitas poucas herbáceas estabelecem-se no solo abaixo destas árvores, podendo indicar potencial alelopático da espécie.

A fitotoxicidade de *P. torta* tem sido estudada, no entanto tais estudos não englobam pesquisas relativas à sazonalidade e método de extração, sendo tais dados imprescindíveis para o direcionamento no estudo fitotóxico da espécie (Nascimento *et al*, 2007; Guimarães *et al*, 2008; Condessa, 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas de *P. torta*, verificando o efeito da sazonalidade e dos métodos de extração a quente e a frio, nas espécies alvo *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária). Ainda, comparar a atividade dos extratos aquosos com extratos obtidos por acetato de etila.

2.4. Metodologia

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Alelopatia *Alfredo Gui Ferreira* e no laboratório de Termobiologia *L.G. Labouriau*, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas, localizado no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

Folhas jovens (acima do segundo nó) de *P. torta* foram coletadas de três matrizes na reserva de cerrado sentido restrito presente no Campus Darcy Ribeiro, da Universidade de Brasília. As matrizes foram georreferenciadas possuindo coordenadas S 15°46'12,0", W 47°52'06,1"; S 15°46'19,3", W 47°52'04,6" e S 15°46'28,1", W 47°52'03,5", altitude 1040 m. A primeira coleta foi feita no mês de julho de 2011 (19/07/2011) após um mês e meio sem chuvas e a segunda coleta foi feita em fevereiro de 2012 (06/02/2012). As folhas foram secas a 50° C/24h e trituradas para o posterior preparo dos extratos.

As folhas secas e trituradas foram submetidas à extração a quente e a frio. Para a extração a quente foram usadas 55g de folhas coletadas em fevereiro para 550 mL de água destilada (10% p/v), e 100g de folhas coletadas em julho para 1000 mL de água destilada (10% p/v). A água foi aquecida a 100 °C e então as folhas foram colocadas em solução e assim permaneceram até que esta estivesse em temperatura ambiente. Para extração a frio foram usados os mesmo pesos e volumes da extração por infusão. As folhas foram adicionadas a água em temperatura ambiente e a solução permaneceu na geladeira ($\pm 6^{\circ}\text{C}$) por 24h. As soluções resultantes das extrações foram filtradas a vácuo em funil de Büchner com papel filtro, congeladas e liofilizadas.

O extrato de acetato de etila foi obtido apenas das folhas coletadas em fevereiro de 2012.

A extração foi feita com auxílio do ultrassom e foram utilizados solventes em polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila. A extração com hexano e diclorometano foi conduzida por duas vezes por 1 hora cada, com renovação do solvente, já para o acetato de etila, sendo o extrato de interesse, o procedimento foi conduzido três vezes. O material obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, usando papel de filtro e após foi seco em evaporador rotativo.

Bioensaios com gergelim e braquiária

Os extratos aquosos e de acetato de etila foram ressuspensos em água destilada nas concentrações 3200, 1600, 800, 400 e 200 ppm. Utilizaram-se placas de petri com 5,5 cm de diâmetro, forradas com papel filtro onde foram aplicadas 1 mL de cada solução. As soluções foram utilizadas em bioensaios de germinação e crescimento. Foram utilizadas 10 sementes por replicata (placa), e 4 replicatas por tratamento. Após a colocação das sementes nas placas, as mesmas foram fechadas com Parafilm[®]. As placas foram mantidas em câmara de germinação a 30 °C por 7 dias. As espécies-alvo utilizadas foram o gergelim (lote de 2006 – germinabilidade 100%) obtido por plantio no Laboratório de Termobiologia e braquiária (Agrocosmos Ltda. - lote de 2011 – germinabilidade 70%) obtida comercialmente.

Na avaliação dos efeitos dos extratos na germinação, foram calculadas a germinabilidade e tempo médio de germinação.

Para obtenção da germinabilidade usou-se a fórmula:

$$\%G = (\sum n_i * N^{-1}) * 100$$

Onde, $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas em relação ao total de sementes dispostas para germinar (N) (Borghetti & Ferreira, 2004).

Para o cálculo do Tempo Médio de Germinação a fórmula usada foi:

$$T_{med} = \sum n_i * t_i / \sum n_i$$

Onde, $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo t_i . Essa informação é expressa em horas (Borghetti & Ferreira, 2004). Para este cálculo o bioensaio foi acompanhado diariamente com intervalos de 24h e as sementes germinadas foram contadas, entretanto, não retiradas das placas para que se avaliassem também os efeitos dos extratos no crescimento inicial das plantas.

Passados os sete dias as plântulas tiveram as partes aéreas e radiculares mensuradas com

auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, precisão de 0,05 mm) e com tais valores foi calculada a porcentagem de inibição em relação ao controle positivo (água destilada).

Para o cálculo de porcentagem de inibição utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = (XT * 100 / XC) - 100$$

Onde XT é a média de crescimento das plântulas tratadas e XC a média de crescimento das plântulas controle.

Análises estatísticas

Para análise da inibição ou estímulo causado nas partes aéreas e radiculares das espécies-alvo em relação ao controle positivo as análises estatísticas foram baseadas em testes paramétricos e não-paramétricos, dependendo dos resultados obtidos. Para dados paramétricos utilizou-se a análise da variância (ANOVA) comparando-se as médias usando o teste de Tukey a 5%. Após tentativa de normalização dos dados onde não se obteve sucesso foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade comparando-se as médias com o teste de Dunn também a 5% de probabilidade, utilizado para dados não paramétricos.

Para determinação da interação dos fatores época de coleta, tipo de extração e concentração aplicou-se o teste de análise de variância fatorial, com três fatores. A depender dos resultados das análises, se pode tratar os dados como independentes e novamente aplicar ANOVA, Kruskal-Wallis, Tukey e Dunn para a verificação da influência da época de coleta e do método de extração.

Para verificar a diferença estatística na germinabilidade, utilizou-se intervalos de confiança (IC), o IC fornece um intervalo de valores plausíveis para o parâmetro baseado nos dados amostrais. Para determinar o IC de um n de 40 sementes utilizaram-se as tabelas científicas de p , com um IC de 95%. (Geigy 1965).

Resultados e discussão

Extratos

Primeiramente foi calculado o rendimento do extrato obtido em relação ao peso das folhas secas de *P. torta* coletadas na estação seca (julho) e estação chuvosa (fevereiro) com dois métodos diferentes para a extração (Figura 10).

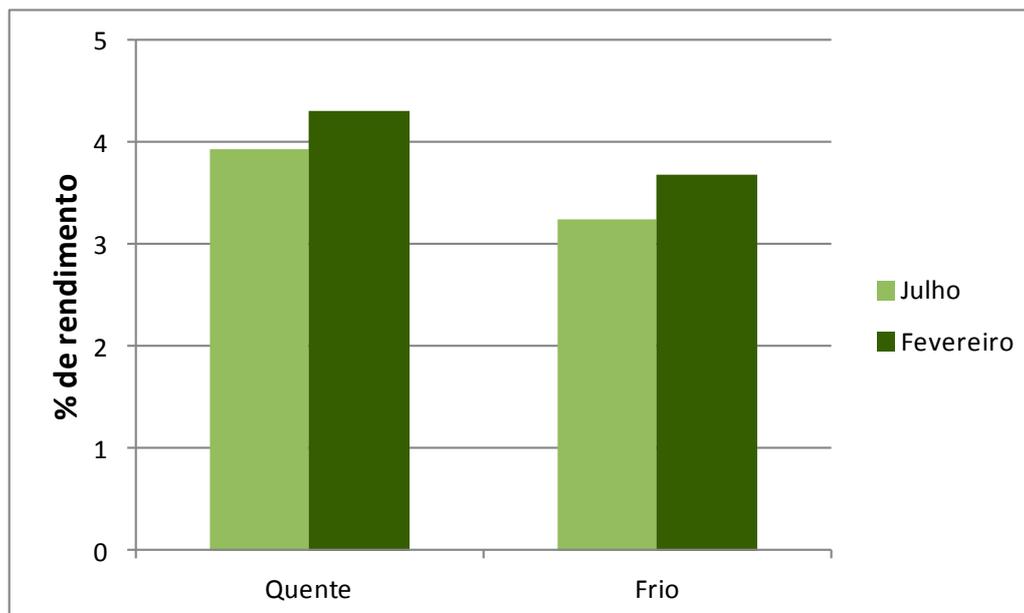


Figura 10. Rendimento dos extratos aquosos de folhas coletadas em julho e fevereiro, em relação ao peso seco das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, obtidos por extração a quente e a frio.

Em relação às duas épocas de coleta, das folhas coletadas em fevereiro obteve-se um maior rendimento em comparação as folhas coletadas em julho. O maior rendimento foi obtido pela extração a quente para as folhas das duas épocas de coleta.

Corroborando com os dados obtidos nesse estudo, Murakami e colaboradores (2009) constataram que o extrato proveniente das folhas coletadas em agosto (inverno) teve o menor rendimento, comparando com extratos obtidos de folhas coletadas nas outras três estações. Os autores justificaram esse resultado por estas folhas possuírem maior quantidade de compostos insolúveis, como componentes de paredes celulares.

De acordo com Falkenberg e colaboradores (2003), a extração a quente pode ser mais rápida e extrair maior quantidade de compostos, sendo assim mais efetiva, entretanto algumas substâncias podem reagir quimicamente em decorrência das altas temperaturas, podendo ocasionar mudanças em produtos que poderiam ser ativos.

Efeitos na germinação

A germinabilidade de gergelim não foi alterada por nenhum dos extratos. O maior índice de germinabilidade (100%) foi obtido em todos os extratos, porém em nem todas as concentrações, e controle; o menor foi 92,5% (Fevereiro frio a 400 ppm). Observando o Intervalo de Confiança do controle em relação com os demais tratamentos, eles se sobrepõem, assim, não apresentando diferença significativa entre os índices de germinabilidade (Figura 11).

Em relação ao tempo médio de germinação das sementes de gergelim o controle germinou com 26,4 horas. A maior diferença foi resultado da atividade do extrato proveniente de fevereiro com extração a frio a 1600 ppm, 28,5 horas (anexos, Tabela 8), causando um atraso de um pouco mais de 2 horas na germinação em relação ao controle, porém, esta diferença em condições naturais, não é significativa no estabelecimento da espécie.

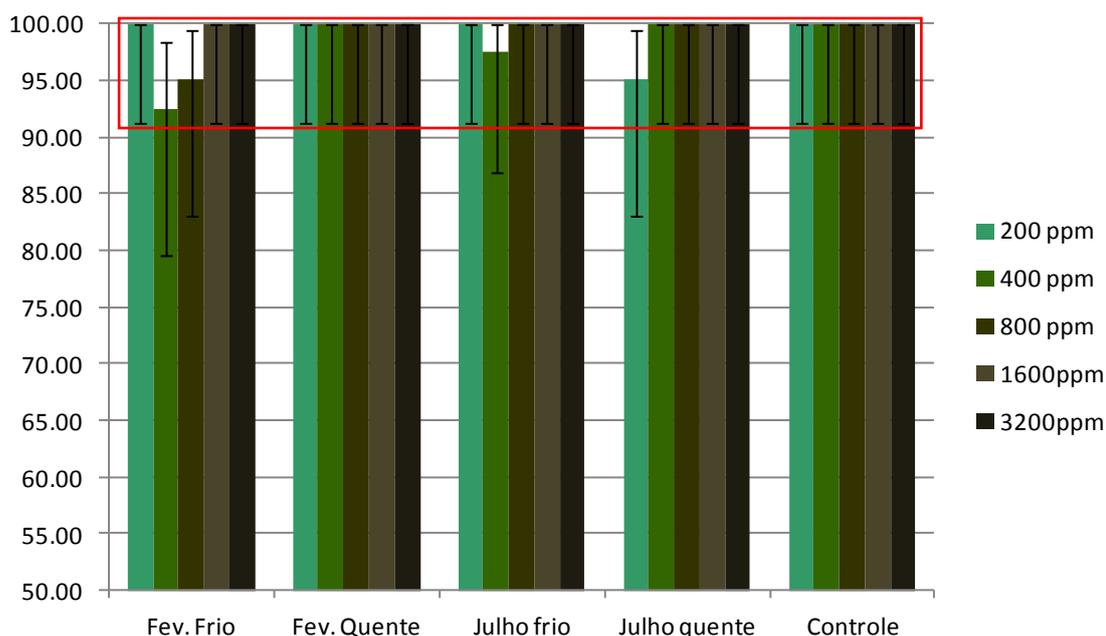


Figura 11. Porcentagem de germinação de sementes de *Sesamum indicum* L. (gergelim) sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Em braquiária a porcentagem de germinação no controle foi 77,5%. O maior índice de germinabilidade foi 92,5%, resultante da ação do extrato das folhas de fevereiro a frio a 800 ppm. O menor índice de germinabilidade, 62,5%, foi efeito do extrato a frio das folhas de julho (3200 e 800 ppm) e o extrato a quente também das folhas de julho (200 ppm). Visto que os

valores de IC, do menor e do maior índice se sobrepõem ao do controle, contata-se que não há diferença significativa destes em relação ao controle (Figura 12).

Ao analisarmos o tempo médio de germinação da braquiária, o controle germinou em 44,9 horas, a maior variação apresentou um atraso um pouco superior a 12 horas, em resultado ao extrato quente das folhas coletadas em fevereiro a 200 ppm, onde a germinação ocorreu em 56,7 horas (anexo, Tabela 9). Novamente ao analisarmos esses dados em condições naturais o estabelecimento da espécie não irá ser afetado por esse pequeno atraso.

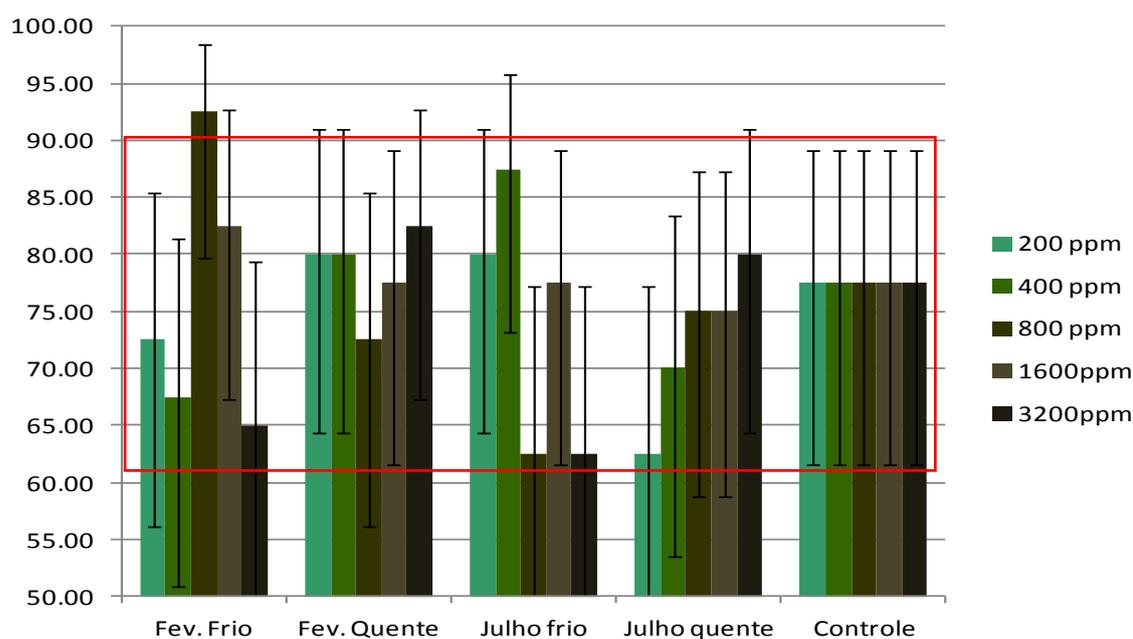


Figura 12. Porcentagem de germinação de sementes de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). * Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Em relação a germinação, as duas espécies apresentaram-se pouco sensíveis aos efeitos dos extratos de *P. torta*, considerando que nem a germinabilidade nem o tempo médio de germinação sofreram efeitos notáveis. Ferreira, 2004 afirma que a germinação é menos sensível aos aleloquímicos. Os dados obtidos corroboram com outros experimentos com extratos de arbóreas nativas do Cerrado onde não foi constatado efeito sobre a germinação de espécies-alvo (Pina *et al*, 2009, Formagio *et al*, 2010).

Efeitos no crescimento inicial

Ao analisarmos o efeito no crescimento inicial no hipocótilo de gergelim pode-se observar que a maior inibição, 15,7%, foi causada pelo extrato obtido a frio das folhas

coletadas em fevereiro na concentração de 800 ppm (Figura 13). Deve-se ressaltar que em todos os extratos na concentração de 3200 ppm houve diminuição no crescimento radicular, mesmo que discreto.

Todos os extratos, em uma ou mais concentrações, causaram efeito estimulatório, especialmente nas concentrações de 400 e 1600 ppm, o estímulo mais significativo foi resultado do extrato das folhas de julho obtido por infusão a 1600 ppm (18,5%).

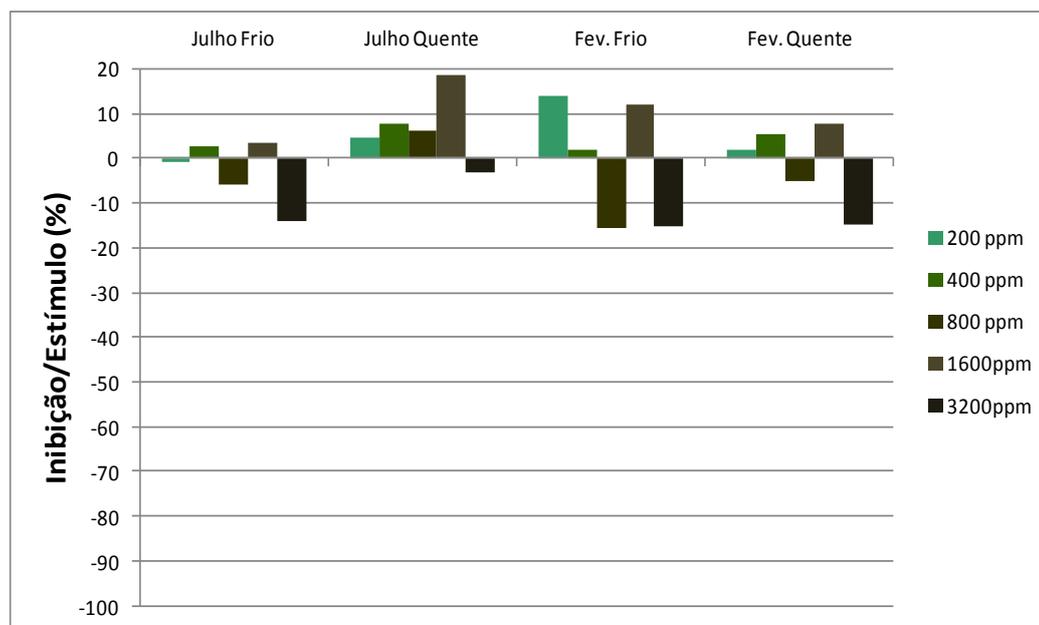


Figura 13. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* L.(gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Considerando a ação dos extratos no crescimento radicular de *S. indicum* verificam-se inibições bastante significativas desde a concentração de 200 ppm em todos os extratos (Figura 14). A partir da concentração de 800 até 3200 ppm em todos os extratos pode-se observar o padrão dose-resposta. Os efeitos mais significativos são resposta dos extratos mais concentrados, chegando a 78% com o extrato a frio de folhas coletadas em julho na concentração de 3200 ppm.

Mesmo apresentando inibições bastante significativas (superiores a 40%) os extratos a frio de folhas de fevereiro, a 200 e 400 ppm, não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, tal resposta se deve ao alto desvio padrão encontrado nas médias (anexos, tabela 6).

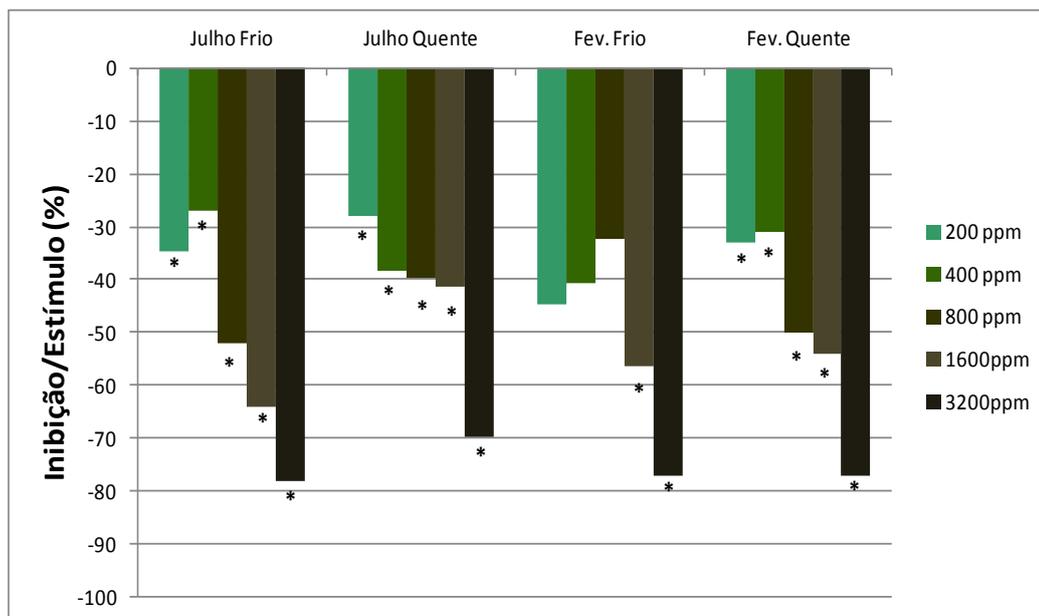


Figura 14. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

O crescimento aéreo de braquiária mostrou-se sensível aos agentes fitotóxicos presentes nos extratos, houve inibição em todas as concentrações de todos os tratamentos (Figura 15). O extrato frio obtido das folhas de julho (800 ppm) foi o mais efetivo, com uma inibição do crescimento de 43,5% em relação ao controle, seguido do extrato a quente das folhas coletadas em fevereiro a 800 e 3200 ppm que causou 41% de inibição.

Não se pode deixar de observar que em três dos quatro extratos (Julho Frio, Julho Quente e Fevereiro Frio) a maior inibição foi encontrada na concentração de 800 ppm.

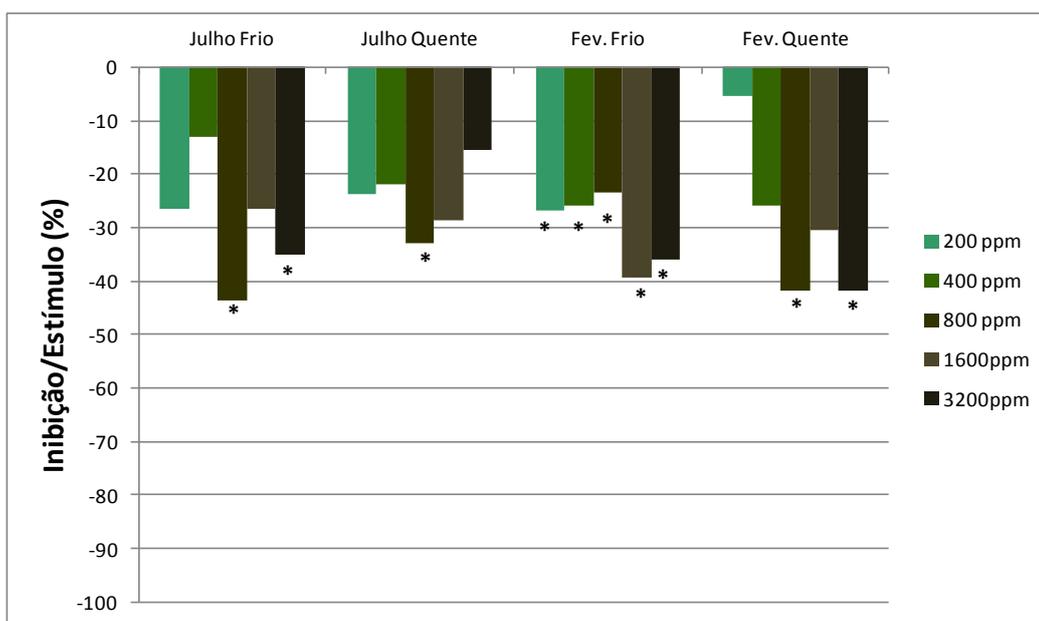


Figura 15. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta*

(Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

A inibição mais significativa no crescimento radicular de braquiária, foi resultado da ação do extrato obtido à quente, na concentração de 3200 ppm, tanto para as folhas coletadas em julho (60,2%), como para aquelas coletadas em fevereiro (59,8%). Os maiores índices de inibição, em todos os tratamentos, foram a 3200 ppm. O crescimento radicular da braquiária mostrou-se menos sensível aos agentes fitotóxicos quando em comparação com o crescimento radicular de plântulas de gergelim (Figura 16).

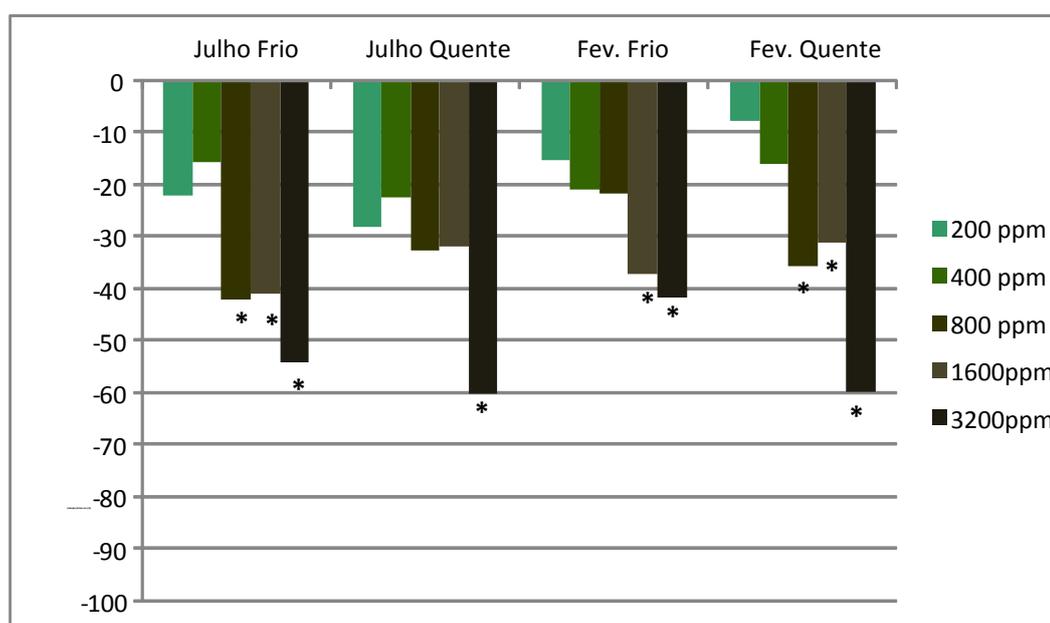


Figura 16. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos aquosos obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk coletadas em julho de 2011 e fevereiro de 2012, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os extratos aquosos mostraram-se bastante ativos no crescimento inicial das duas espécies-alvo. Em outros trabalhos, extratos de *P. torta* têm sido efetivos na inibição do crescimento de espécies-alvo. Nascimento e colaboradores (2007) testaram o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas verdes e senescentes de *P. torta* em sementes de alface. Apenas os extratos de folhas verdes tiveram atividade diminuindo a germinação de sementes de alface. Em relação ao crescimento inicial das plântulas, tanto os extratos de folhas verdes como extratos de folhas senescentes foram inibitórios apresentando inibições superiores a 70%. Condessa (2011) testou extratos foliares aquosos e hexânicos de *P. torta* em alface e tomate. Com ambas as espécies-alvo a inibição foi mais significativa com extratos aquosos, chegando ao índice de inibição 74% no alongamento radicular de tomate.

Nas duas espécies-alvo o crescimento radicular foi mais sensível aos extratos de *P. torta* do que o hipocótilo. Da mesma maneira Guimarães e colaboradores (2008), testando extrato aquoso de folhas frescas ou secas trituradas de *P. torta*, encontraram inibição significativa no crescimento radicular de plântulas de gergelim (>50%), porém não houve inibição significativa do crescimento do hipocótilo em relação ao controle. Tal resultado corrobora com o que é normalmente encontrado em estudos de fitotoxicidade (Correia *et al*, 2005; Giotto *et al*, 2007; Viecelli & Cruz-Silva, 2009; Oliveira, 2009; Allem, 2010; Pelegrini & Cruz-Silva, 2012),

A maior inibição do crescimento radicular pode ser devido ao seu contato mais direto com o papel filtro assim a absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares foi favorecida. A capacidade de translocação do aleloquímico da raiz para a parte aérea e o mecanismo de ação do mesmo também devem ser considerados, assim certas substâncias podem causar inibições em um órgão e pequenos incrementos em outro, variando os efeitos conforme o órgão da planta onde eles atuam (Chung *et al*, 2001; Correia *et al*, 2005; Maraschin-Silva & Aquila, 2006)

O crescimento aéreo de gergelim foi estimulado quando em contato com os extratos Maraschin-Silva & Aquila (2006), testaram os efeitos fitotóxicos de extratos de *Erythroxylum argentinum*, *Luehea divaricata*, *Myrsine guianensis* sob o crescimento de alface e também contataram estímulos no hipocótilo.

Relação da atividade fitotóxica com a época de coleta e tipo de extração.

Para identificar se ação dos extratos nas plântulas de gergelim e braquiária é influenciada pela época de coleta das folhas ou pelo método de extração precisa-se primeiramente verificar se tais variáveis tem interação entre si. Para tal aplicou-se o teste de análise de variância fatorial, incluindo três fatores (época de coleta, tipo de extração e concentração). Sendo que nenhum dos valores para *p* foi menor do que 0,05, conclui-se que as uma variável não interfere significativamente na outra, assim pode-se tratá-las como fatores independentes (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2. Resultados da análise de variância fatorial de interação entre os fatores época de coleta, tipo de extração e concentração dos extratos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk para parte aérea (PA) e parte radicular (PR) de *Sesamum indicum* L. (gergelim). Valores de *p* menores que 0,05 demonstram interação significativa entre as variáveis.

	PA	PR
Época de coleta x Concentração	0.1998	0.8649
Época de coleta x Tipo de extração	0.091	0.5389
Concentração x Tipo de extração	0.613	0.713

Tabela 3. Interação entre os fatores época de coleta, tipo de extração e concentração dos extratos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk para parte aérea (PA) e parte radicular (PR) de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Valores de p menores que 0,05 demonstram interação significativa entre as variáveis

	PA	PR
Época de coleta x Concentração	0.6744	0.611
Época de coleta x Tipo de extração	0.6056	0.347
Concentração x Tipo de extração	0.8756	0.5011

Época de coleta

Para as avaliações de diferença estatística em relação à época de coleta, utilizaram-se apenas as concentrações de 3200 ppm de todos os extratos, por ter sido a mais efetiva na maior parte dos bioensaios de crescimento inicial nas espécies alvo.

Assim, compararam-se os mesmos métodos de extração, na mesma concentração nas diferentes épocas de coleta, resultando em comparações entre o extrato de Julho Quente 3200 ppm e Fevereiro Quente a 3200 ppm, e Julho frio a 3200 ppm e Fevereiro Frio independente para parte aérea e radicular de cada espécie.

Para gergelim não se verifica diferença estatística em nenhuma das quatro comparações. Assim, não é mostrado efeito da sazonalidade no crescimento inicial de gergelim (

Tabela 4).

Tabela 4. Análise dos efeitos da sazonalidade de extratos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk em plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos obtidos pela mesma técnica de extração e em diferentes épocas de coleta. * indica diferença significativa com $p < 0,05$.

		Quente		Frio	
		PA	PR	PA	PR
Época de extração	Julho	1,96	1,59	1,71	1,15
	Fevereiro	1,55	1,05	1,53	1,05

O mesmo padrão encontrado em gergelim é encontrado em braquiária, para as quatro comparações realizadas, não se verifica diferença estatística para a época de coleta para o efeito dos extratos no crescimento inicial da espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Análise dos efeitos da sazonalidade de extratos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk em plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos obtidos pela mesma técnica de extração e em diferentes épocas de coleta. * indica diferença significativa com $p < 0,05$.

		Quente		Frio	
		PA	PR	PA	PR
Época de extração	Julho	2,87	3,20	2,35	3,42
	Fevereiro	2,09	3,05	2,30	4,48

Tanto para a parte aérea como para a parte radicular das duas espécies-alvo não houve diferença estatística dependente da sazonalidade. Jacobi & Ferreira (1991), testando extratos de folhas de *Mimosa bimucronata* coletadas nas quatro estações do ano, verificaram que as folhas jovens (primavera) não tiveram efeito na germinação, porém folhas mais velhas (verão, outono e inverno) inibiram a germinação das espécies sensíveis (alface, cenoura, chicória e tomate). Entretanto, corroborando com o encontrado nesse estudo, o crescimento foi afetado pelos extratos das folhas coletadas em qualquer época do ano, mesmo nas espécies em que a germinação não foi havia sido inibida (arroz, couve, pepino e repolho).

Em estudo sobre a influência de extratos de folhas de *Solanum lycocarpum*, *Solanum subumbellatum*, *Solanum granuloso-leprosum* coletadas em duas estações (seca e chuvosa) encontrou-se efeito da época de coleta e justifica-se tal resultado ao estresse causado no período da seca que influenciou diretamente a presença de aleloquímicos nas folhas das espécies estudadas reduzindo o crescimento da espécie alvo, o gergelim (Oliveira, 2009).

Murakami e colaboradores (2009), em bioensaios com *Aloe arborescens*, observaram maior variação sazonal no efeito fitotóxico de extratos etanólicos sobre o crescimento das plântulas de alface, sendo mais pronunciado nos meses de verão e outono. Por outro lado, o efeito fitotóxico de extratos clorofórmicos mostrou-se pouco influenciado pelo período de coleta.

Viecelli & Cruz-Silva (2009), testaram diferentes métodos de extração e diferentes épocas de coleta de folhas de *Salvia officinalis* sobre o desenvolvimento de sementes e plântulas de alface e observaram variação na atividade em função época de coleta das folhas, com maior atividade nas radículas da planta alvo. Da mesma forma, Pelegrini e Cruz-Silva (2012), testaram extratos de *Coleus barbatus*, coletadas nas quatro estações do ano, os extratos apresentaram efeito alelopático sobre a germinação e o crescimento de alface, sendo que estes variaram em função da sazonalidade da coleta.

Diferentes metodologias de extração podem extrair diferentes substâncias que podem, ou não, ter efeito no desenvolvimento de espécies alvo. Ainda, algumas substâncias podem ter modificações na sua produção dependendo da época do ano e de eventuais estresses a que possam ser submetidas. Contudo, a variação da atividade em decorrência da época de coleta pode ser nula ou expressa, dependendo de vários fatores.

Método de extração

Da mesma forma utilizada para as avaliações relacionadas à época de coleta, utilizaram-se apenas as concentrações de 3200 ppm de todos os extratos, no entanto as comparações foram das mesmas épocas de coleta das folhas, na mesma concentração, com os dois diferentes métodos de extração. As comparações resultantes foram entre os extratos de Julho Quente 3200 ppm com Julho frio a 3200 ppm, e Fevereiro Quente 3200 ppm com Fevereiro Frio 3200 ppm, independente para parte aérea e radicular de cada espécie.

Para gergelim não houve diferença para os dois diferentes métodos de extração. Assim, tanto a extração a frio como a quente mostram-se efetivas na obtenção de substâncias fitotóxicas (Tabela 6).

Tabela 6. Análise dos efeitos dos diferentes métodos extração das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk em plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos de folhas coletadas na mesma época e obtidos com diferentes métodos de extração. * Indica diferença significativa com $p < 0,05$.

		Julho		Fevereiro	
		PA	PR	PA	PR
Extração	Quente	1.96	1.59	1.55	1.05
	Frio	1.71	1.15	1.53	1.05

Entretanto, para braquiária houve diferença significativa no crescimento da parte aérea, entre os as duas metodologias de extração. O extrato obtido por infusão de folhas coletadas em fevereiro foi significativamente mais efetivo que o extrato a frio. Para as folhas coletadas em julho não houve diferença nas metodologias de extração (Tabela 7).

Tabela 7. Análise dos efeitos dos diferentes métodos extração das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk em plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária). Comparação do tamanho (cm) entre partes aéreas (PA) e partes radiculares (PR) separadamente sob o efeito de extratos de folhas coletadas na mesma época e obtidos com diferentes métodos de extração. * Indica diferença significativa com $p < 0,05$.

		Julho		Fevereiro	
		PA	PR	PA	PR
Extração	Quente	2.87	3.20	2.09	3.05
	Frio	2.35	3.42	2.30	4.48*

Na maior parte dos resultados analisados os diferentes métodos de extração não apresentaram diferença nos efeitos dos extratos nas espécies-alvo.

Em bioensaios realizados com extratos foliares obtidos com extração aquosa a frio e a quente, de *Erythroxylum argentinum*, *Luehea divaricata*, *Myrsine guianensis* e *Ocotea puberula* comparou-se os efeitos dos extratos sobre as raízes de alface. Observaram-se diferenças significativas causadas por extratos de mesma concentração apenas nos bioensaios com *E. argentinum* e *L. divaricata*, sendo o extrato preparado a quente mais efetivo. Porém, os efeitos

causados pelos extratos de obtidos por diferentes metodologias de *M. guianensis* e *O. puberula* não diferiram entre si, indicando que nem sempre um extrato preparado com altas temperaturas apresentará efeito mais acentuado em relação a um extrato preparado a frio (Maraschin-Silva & Aquila, 2006).

Oliveira e colaboradores (2012) avaliaram o potencial alelopático de diversos órgãos de jucá (*Caesalpineia ferrea*) sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de alface, para isto os extratos foram obtidos por infusão e com água em temperatura ambiente. Como resultado, todas as características apresentaram menor valor médio quando as sementes foram submetidas ao extrato obtido a 100°C.

Diferentemente, Giotto e colaboradores (2007) avaliando os efeitos de extratos de *Eugenia dysenterica*, obtidos por diferentes metodologias, no crescimento de alface verificaram que parte radicular é a mais sensível e a parte aérea teve influência em relação aos tipos de extração. Na extração com água fria, houve redução significativa no crescimento das plântulas ao contrário da extração com água quente que estimulou o crescimento da parte aérea em algumas concentrações.

Dessa forma pode-se concluir que a temperatura da extração pode ou não influenciar nas substâncias fitotóxicas extraídas, tal efeito pode ser diferentemente expressado se considerarmos, além da técnica de extração, a espécie, a época de coleta, os diferentes órgão das plantas e ainda a idade desses órgãos.

Comparação do efeito do Extrato Aquoso com o Extrato de Acetato de Etila

Para nível de comparação entre a atividade fitotóxica de um extrato de polaridade intermediária (obtido com o solvente orgânico acetato de etila) em relação aos extratos aquosos, foram testados nas mesmas concentrações o extrato de AcoEt em gergelim e braquiária (Figura 17 e Figura 18).

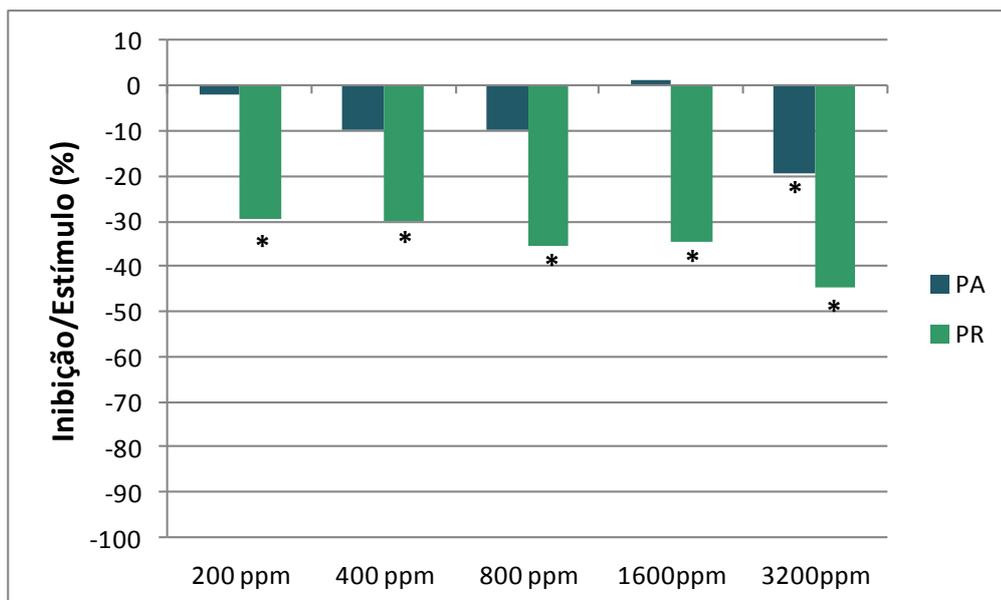


Figura 17. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos de acetato de etila obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

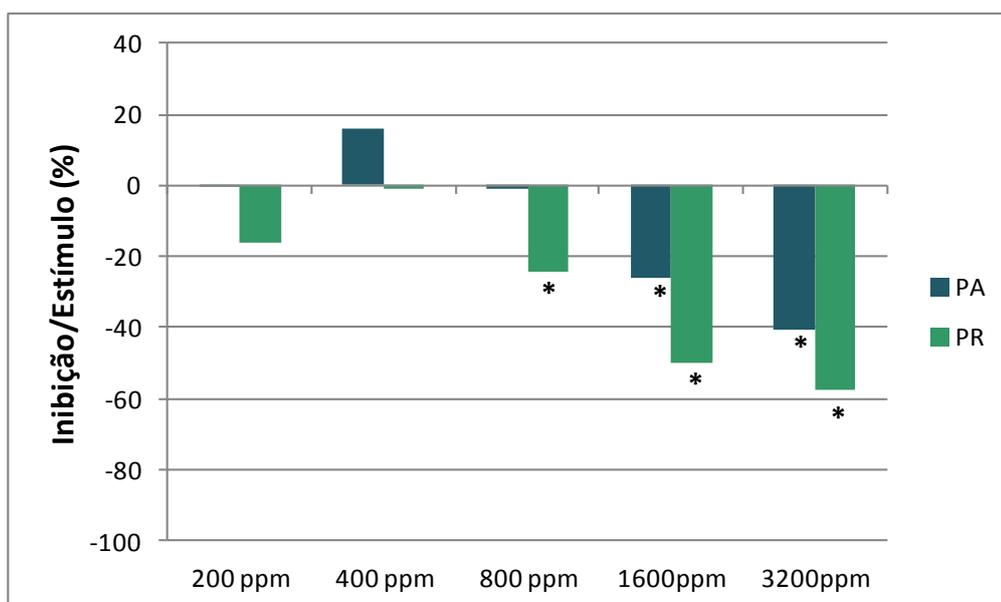


Figura 18. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência dos extratos de acetato de etila obtidos das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

A maior discrepância em comparação ao extrato aquoso com o extrato de AcoEt foi no bioensaio com gergelim. Neste, a maior inibição do extrato obtido com o solvente orgânico foi 44,6% a 3200 ppm, na radícula, enquanto que com os extratos aquosos independente do método de extração ou época de coleta tiverem a 3200 ppm uma inibição em torno de 75%. No entanto, não podemos deixar de observar que os hipocótilos das plântulas de gergelim em sua maioria, tiveram inibição no seu crescimento, ao contrário da resposta em relação aos extratos aquosos.

Os resultados em relação à braquiária também mostraram os extratos aquosos mais efetivos em relação aos extratos obtidos com o solvente orgânico. A maior inibição foi na radícula da gramínea na concentração de 3200 ppm (57,5%), enquanto nos extratos aquosos a inibição da radícula esteve em torno de 60% a 3200 ppm para folhas coletadas em julho e fevereiro com extração a quente.

Tais resultados corroboram com os resultados conseguidos por Condessa (2011), supracitados, onde extrações que visam substâncias mais polares são mais efetivas quanto à ação fitotóxica.

De acordo com Falkenberg e colaboradores (2003), deve-se levar em conta a eficiência, a disponibilidade dos meios e o custo do processo de extração escolhido, nesse estudo a extração aquosa é mais rápida e com menor custo, além de ser a mais efetiva, justificando ser a indicada para a obtenção de compostos com ação fitotóxica para a espécie estudada.

2.5. Referências

- ALLEM, L.N. 2010. Atividade alelopática de extratos e triturados de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) sobre o crescimento inicial de espécies alvo e identificação de frações ativas através de fracionamento em coluna cromatográfica. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Botânica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. 56p.
- ALVES, S.M.; ARRUDA, M.S.P.; SOUZA FILHO, A.P.S. 2002. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. In: SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 79-109.
- BARNES, J.P.; PUTNAM, A.R. 1986. Evidence for allelopathy by residues and aqueous extracts of rye (*Secale cereale*). *Weed Science* 34: 384-390.
- BORGHETTI, F., FERREIRA, A.G., 2004. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A.G & BORGHETTI, F. (eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. p.209-222.
- CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L. & TAKAKI, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botanica Brasilica* 21(3):697-705.
- CHOU, C.H.; KUO, Y.L. 1986. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. III. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Journal of Chemical Ecology*, 12:1431-1448
- CHUNG, I.M.; AHN, J.K.; YUN, S.J. 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, 20 (10): 921-928.
- CONDESSA, B. M. 2011. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 101p.
- CORREIA, N.; CENTURION, M., ALVES, P. 2005. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. *Ciência Rural*, 35 (3):498-503.
- EINHELLING, F. 2004. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS, F.; GALINDO, J.; MOLINILLO J.; GUTTER, H. *Allelopathy, Chemistry and Mode of action of Allelochemicals*. Boca Ratón: CRC Press. p.372.
- FALKENBERG, B.M., SANTOS, I., SIMÕES, O.M. 2003. Introdução da análise fitoquímica. In: SIMÕES, O.M.C. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2003. p.229-244.

- FERRI, H.P., 1996. Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: STASI, C.L., (Eds). *Plantas Medicinais: Arte e Ciência*. São Paulo: Editora Unesp. 1996. p.129-156.
- GEIGY, J.R. 1965. Limites exactos de confianza para *p*. In: GEIGY, J.R. *Tablas científicas*. Espanha: J.R. Geisy S.A. Basilea (Suiza). 6ed. 1965. p.783.
- GIOTTO, A.C.; OLIVEIRA, S.C.C. & SILVA, J.G.P. 2007. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências*(5)2:600-602.
- GUIMARÃES, E.S.L., MOTTA, M.C.F., BORGHETTI, F. 2008. Efeitos alelopáticos de folhas inteiras e trituradas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk sobre o desenvolvimento inicial de *Sesamun indicum* L. IX Simpósio Nacional Cerrado.
- HARIDASAN, M. 2000. Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*(12)1: 54-64.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review* (61)1:28-44
- JACOBI, S.U.; FERREIRA, A.G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucromata* (DC) OK. sobre as espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26(7): 935-943.
- LOPEZ, K.S.E. 2005. Estudo químico e atividade biológica de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk (Sapotaceae). Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 78p.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. 2006. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. *Revista Árvore*(30)4: 547-555.
- MARQUIS, R.J.; MORAIS H.C.; DINIZ, I.R.. 2002. Interactions among Cerrado plants and their herbivores: unique or typical. In: *The Cerrados of Brazil – Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. OLIVEIRA, P.S. & MARQUIS, R.J. (eds). Columbia University Press. 424 p
- MORGAN, E.C; OVERHOLT W.A. 2005. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants. *Journal of the Torrey Botanical Society* 132(1):11-15.
- MURAKAMI, C.; CARDOSO, F.L. & MAYWORM, M.A.S. 2009. Potencial fitotóxico de extratos foliares de *Aloe arborescens* Miller (Asphodelaceae) produzidos em diferentes épocas do ano. *Acta Botanica Brasilica*, 23(1):111-116.
- NASCIMENTO, M.C., ALCANTARA S.F., HADDAD, C.R.B., MARTINS, F.R. 2007. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. *Allelopathy Journal* (20)2: 279-286.

- OLIVEIRA, A.K.; COELHO, M.F.B.; MAIA, S.S.S; DIÓGENES, F.E.P. 2012. Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferrea* na germinação de alface. *Ciência Rural*, 42(8):1397-1403.
- OLIVEIRA, S.C.; FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. 2004. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 401-406.
- OLIVEIRA, S.C.C. 2009. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. Tese de Doutorado. Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. 190p.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A.J. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Química Viva*. (7)1:2-34.
- PELEGRINI, L.L.; CRUZ-SILVA, C.T.A. 2012. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* (14)2:376-382.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A. & LIMA, M.I.S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica* 18(3):425-430.
- SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F.; MENDES, A.N.G.; MORAIS, A.R.; CONCEIÇÃO, H.E.O. & MARINHO, J.T.S. 2002. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento de caruru-de-mancha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (37)6: 783-790.
- SARTOR, L.R.; ADAMI, P.F.; CHINI, N.; MARTIN, T.N.; MARCHESE, J.A. & SOARES, A.B. 2009. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. *Ciência Rural* (39)6: 1653-1659.
- SILVA JÚNIOR, M.C. 2005. *100 árvores do Cerrado-Guia de campo*. Rede de Sementes do Cerrado. 278 p.
- VIECELLI, A.C.; CRUZ-SILVA, C.A.T. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. *Semina: Ciências agrárias*,(30)1:39-46.
- YU, J.Q; YE, S.F; ZHANG, M.F.; HU, W.H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical, Systematics and Ecology* (31)129-139.

3. Capítulo 2.

**Avaliação fitotóxica de extratos foliares
de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk
(Sapotaceae) em *Sesamum indicum*
(gergelim) e *Urochloa decumbens*
(braquiária) e contribuição para a
fitoquímica da espécie.**

3.1. Resumo

Várias espécies do Cerrado tem tido seu potencial alelopático e fitotóxico estudado na sua maioria tem sido efetivas na inibição do crescimento das espécies alvo testadas. Uma delas é a *Pouteria torta* que também tem sido visada farmacologicamente como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (Silva *et al*, 2009). O objetivo desse trabalho foi verificar a bioatividade de extratos foliares de *P. torta* obtidos com o solvente orgânico acetato de etila, na germinação e crescimento inicial de *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária). Além disto, identificar produtos bioativos presentes nas frações. Os extratos foram obtidos de folhas jovens coletadas de indivíduos adultos, que foram secas e trituradas para preparo dos extratos. Foram utilizados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol em ordem crescente de polaridade. Os extratos foram filtrados, secos em rotavapor e ressuspensos em água nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. A atividade biológica de tais extratos foi testada no crescimento inicial de *Sesamum indicum*, o gergelim. O extrato mais ativo, proveniente de acetato de etila, foi fracionado, por grau de polaridade em cromatografia líquida em coluna e as frações tiveram sua atividade avaliada na germinação e crescimento de gergelim e braquiária. Buscou-se a identificação de substâncias nas frações com auxílio de reações colorimétricas em cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). As espécies-alvo foram mais sensíveis ao extrato de acetato de etila antes do seu fracionamento, apontando um efeito sinérgico das substâncias. Compostos fenólicos foram identificados em todas as frações e na fração um (F1) puderam ser identificados dois triterpenos, α e β -amirina.

Palavras chave: amirina, bioatividade, solventes orgânicos, cromatografia

3.2. Abstract

A lot of species of Cerrado has had their alleopathic and phytotoxic potential studied and most species has been effective in inhibiting the growth of target species tested. One is *Pouteria torta*, which has also been pharmacologically targeted as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal (Silva et al, 2009). The aim of this study is to verify bioactivity of leaf extracts of *P. torta*, obtained with the organic solvent ethyl acetate, in germination and early growth of *Sesamum indicum* and *Urochloa decumbens*. Moreover, to identify bioactive products present in fractions, extracts were taken from young leaves of adult individuals. Leaves were dried and crushed in order to prepare extracts. The extracts were obtained using solvents hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol in order of increasing polarity. The extracts were filtered, dried in rotary evaporator and resuspended in water at the concentrations 800, 400, and 200 ppm. Biological activity of these extracts was tested in initial growth of *Sesamum indicum*. The most active extract from ethyl acetate was fractionated by degree of polarity in liquid column chromatography and the activity of the fractions was evaluated on germination and growth of sesame and brachiaria. We sought to identify substances in the fractions with the aid of colorimetric reactions in thin layer chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The target species were more sensitive to the ethyl acetate extract prior fractionation, indicating a synergistic effect of substances. Phenolic compounds were identified in all fractions and one fraction (F1) could be identified two triterpenes, α and β -amyrin.

Key words: amyirin, bioactivity, organic solvents, chromatography

3.3. Introdução

Todos os organismos precisam transformar, consumir e/ou interconverter um vasto número de compostos orgânicos, necessários à sua sobrevivência e reprodução. Tais compostos fornecem energia sob a forma de ATP, e precursores para construir seus próprios tecidos. Uma rede integrada de enzimas é utilizada para esta finalidade, estabelecendo as conhecidas vias metabólicas que, por sua vez, constituem o denominado metabolismo vegetal (Dewick, 2002).

Apesar da variedade de características de vida dos organismos as vias metabólicas trabalham primeiramente para modificar e sintetizar carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Esses processos demonstram a unidade fundamental de toda a vida e são coletivamente descritos como metabolismo primário (Dewick, 2002).

Em contraste com as rotas de metabolismo primário, o metabolismo secundário caracteriza-se por rotas que geram componentes que tem uma distribuição mais limitada e menos conservada entre os organismos. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou, popularmente, produtos naturais (Dewick, 2002). Em decorrência desse aparecimento descontínuo e diversificado no reino vegetal esses metabólitos podem servir para caracterização de grupos taxonômicos (Taiz & Zeiger, 2004).

As plantas produzem metabólitos secundários que variam em qualidade e quantidade de espécie para espécie. A quantidade dos produtos secundários ainda pode variar conforme o local de ocorrência da espécie e/ou seu ciclo de vida, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes a que as plantas estão exposta (Espindola-Darvenne, 2007).

As plantas utilizam essas substâncias em um fenômeno denominado alelopatia que pode ser descrita, como todos os processos envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos que influenciam o desenvolvimento natural e sistemas agrícolas (Sociedade Internacional de Alelopatia, 2012). Sendo um fenômeno puramente natural e ecológico tais efeitos podem proporcionar vantagens contra plantas concorrentes, concedendo vantagens adaptativas à planta produtora.

Uma área de estudo muito confundida com a alelopatia é a fitotoxicidade, que se diferencia da primeira, pois esta pode não ser um fenômeno natural. O estudo pode visar à busca de substâncias que atuem no desenvolvimento vegetal, independentemente das interações em seu ambiente natural. Para a fitotoxicidade os extratos vegetais podem obtidos por meio de solventes orgânicos, como metanol, acetato de etila e diclorometano e os bioensaios podem ser feitos em condições de laboratório, podendo ignorar as variáveis encontradas em campo

(Inderjit *et al*, 2001; Blum, 2011).

O Cerrado caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos, um clima classificado predominantemente como Aw de Koppen (tropical chuvoso). O tipo de solo predominante do Bioma são os Latossolos abrangendo aproximadamente 48% do território, esse tipo de solo é caracterizado por ser profundo, distrófico, ácido e de baixa a média capacidade de troca catiônica, e escasso de nutrientes (Reatto *et al*, 2008). As condições ambientais do bioma cerrado, que sofre com seca, com solo pobre em nutrientes e rico em alumínio, podem estimular a produção dos metabólitos secundários, elevando a diversidade química das espécies ali ocorrentes (Espíndola-Darvenne, 2007).

Várias espécies do Cerrado tem tido seu potencial alelopático e fitotóxico pesquisado *Adiantum serratodentatum*, *Adiantum tetraphyllum*, *Pityrogramma calomelanos* (Peres *et al*, 2004), *Pouteria torta* (Nascimento *et al*, 2007), *Pterodon emarginatus* (Hernandez-Terrones *et al*, 2007), *Sapindus saponaria* (Grisi *et al*, 2012), *Solanum lycocarpum* (Oliveira *et al*, 2004), *Solanum palinacanthum* (Oliveira & Campos, 2006), *Pouteria ramiflora*, *Stryphnodendron adstringens*, *Styrax ferrugineus*, *Vochysia tucanorum*, *Machaerium villosum*, *Kielmeyera variabilis*, *Didymopanax vilosum* (Silva *et al*, 2006).

Pouteria torta (Mart.) Radlk (Sapotaceae) ocorre no cerrado sentido restrito, campos e cerradão, no DF e estados BA, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PI e RO. Constitui-se de uma espécie arbórea semidecídua e tem nome popular de grão-de-galo (Silva-Júnior, 2005). As plantas desse gênero têm sido utilizadas na construção civil, na alimentação e também na medicina popular. Algumas atividades medicinais são reportadas às espécies desse gênero, tais como, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (Silva *et al*, 2009).

Considerando que há relatos na literatura de atividade fitotóxica de *P. torta* e de outras espécies do gênero e há a necessidade de investigar os compostos secundários responsáveis por tal efeito. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi verificar a bioatividade de extratos foliares de *Pouteria torta*, obtidos com o solvente orgânico acetato de etila, na germinação e crescimento inicial de *Sesamum indicum* (gergelim) e *Urochloa decumbens* (braquiária) e ainda contribuir no estudo fitoquímico da espécie identificando produtos presentes nas frações.

3.4. Metodologia

Local de estudo.

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Alelopatia *Alfredo Gui Ferreira* e no laboratório de Termobiologia *L.G. Labouriau*, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas, localizado no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

Preparo dos extratos

Em estudos preliminares de Allem e colaboradores (2009), extratos brutos obtidos com solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol foram testados no crescimento inicial de gergelim, os resultados indicaram o extrato de acetato de etila como mais efetivo.

A partir destes resultados, para novos bioensaios, foram feitas duas coletas de folhas jovens (acima do segundo nó) de *P. torta* de três matrizes, cujas coordenadas são S 15°46'12,0", WO 47°52'06,1"; S 15°46'19,3", WO 47°52'04,6" e S 15°46'28,1", WO 47°52'03,5", altitude 1040 m, na reserva de cerrado sentido restrito presente no Campus Darcy Ribeiro, da Universidade de Brasília. A primeira coleta foi feita no mês de julho de 2011 (19/07/2011) após um mês e meio sem chuvas. Para essas folhas utilizou-se o método de extração com auxílio de soxhlet. A segunda coleta foi feita em fevereiro de 2012 (06/02/2012), já o extrato obtido dessas folhas foi preparado com auxílio do ultrassom. Para ambos os casos as folhas foram secas a 50° C/24h e trituradas para o posterior preparo dos extratos. Para extração com soxhlet e ultrassom foram utilizadas, respectivamente 80 e 400 g de folhas. Tanto para o método com soxhlet como para a extração com auxílio do ultrassom foram utilizados solventes em polaridade crescente para preparo dos extratos: hexano, diclorometano e acetato de etila. O material obtido foi filtrado a vácuo a vácuo em funil de Büchner, usando papel de filtro e após foi seco em evaporador rotativo. Após foi calculado o rendimento do extrato em relação ao peso seco das folhas utilizadas para a extração.

Com o método de extração pelo ultrassom, a extração com hexano e diclorometano foi conduzida por duas vezes no sonicador por 1 hora cada, com renovação do solvente, já para o acetato de etila, sendo o extrato de interesse, o procedimento foi conduzido três vezes.

Para extração com soxhlet cada solvente foi mantido no sistema fechado por aproximadamente dois dias, até que ao passar pelas folhas, para extração, o solvente se mantivesse incolor, indicando que as substâncias que a serem extraídas pelo solvente já não estavam presentes nos tecidos foliares.

Cromatografia em coluna da fração bioativa

Sendo o extrato de acetato de etila o mais efetivo este foi subfracionado por cromatografia em coluna de sílica gel (60 cm altura e 3 cm de diâmetro). Foram utilizados os eluentes acetato de etila: hexano em ordem crescente de polaridade (10 a 100%), acetona e

metanol, a quantidade de solvente aplicado foi determinada pela capacidade de arraste em cada concentração. Foram coletadas subfrações que posteriormente foram agrupadas com base na cromatografia em camada delgada (CCD) de acordo com a semelhança e pureza dos componentes revelados. A cromatografia por camada delgada foi realizada em placas (Alugram Sil G/ UV254) de tamanho 4x5 cm, com eluente acetato de etila: hexano, reveladas com Oleum (ácido sulfúrico, água e ácido acético, na proporção 1:4:20) e queimadas a aproximadamente 150° C. As subfrações foram agrupadas e secas em evaporador rotativo e diluídas com acetato de etila nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm para serem testadas em bioensaios.

Bioensaios com gergelim e braquiária

As espécie-alvo utilizadas foram o gergelim (lote de 2006 – germinabilidade 100%) obtido por plantio no Laboratório de Termobiologia e braquiária (Agrocosmos Ltda. - lote de 2011 – germinabilidade 70%) obtida comercialmente.

Utilizaram-se placas de petri com 5,5 cm de diâmetro, forradas com papel filtro. Foram aplicadas 1 mL de cada solução (extrato das subfrações mais acetato de etila) após, deixou-se as placas em capela de exaustão por pelo menos 20 horas para que o solvente evaporasse, então foi adicionada água destilada em quantidade que se mantivesse a concentração estipulada. As soluções foram utilizadas em bioensaios de germinação e crescimento inicial.

Para bioensaios de germinação foram usadas sementes não germinadas e para bioensaios de crescimento as sementes de gergelim foram previamente germinadas por 24h e as sementes de baquiária por 48h em água destilada, antes da aplicação dos tratamentos. Após a colocação das sementes nas placas, as mesmas foram fechadas com Parafilm[®]. As placas foram mantidas em câmara de germinação à 30 °C por 7 dias nos experimentos de germinação e por 5 dias nos experimentos de crescimento inicial. Como controle positivo foi usado água destilada. Foram utilizadas 10 sementes por replicação (placa), e 4 replicações por tratamento.

No experimento de germinação, foi obtida a germinabilidade e tempo médio de germinação, para isso o bioensaio foi acompanhado diariamente com intervalos de 24h e as sementes germinadas foram contadas, mas não retiradas das placas.

Para obtenção da germinabilidade usou-se a fórmula:

$$\%G = (\sum n_i * N^{-1}) * 100$$

Onde, $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas em relação ao total de sementes dispostas para germinar (N) (Borghetti & Ferreira, 2004).

Para o cálculo do Tempo Médio de Germinação a fórmula usada foi:

$$T_{med} = \sum n_i * t_i / \sum n_i$$

Onde, $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo t_i . Essa informação é expressa em horas (Borghetti & Ferreira, 2004).

No experimento de crescimento as plântulas tiveram as partes aéreas e radiculares medidas com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, precisão de 0,05 mm) e com tais valores foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle positivo (água destilada).

As plântulas dos bioensaios de germinação (sementes não previamente germinadas em água) também tiveram suas partes aéreas e radiculares medidas e calculado o percentual de inibição do crescimento para comparação com o bioensaio de crescimento (sementes previamente germinadas em água).

Para o cálculo de porcentagem de inibição utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = (XT * 100 / XC) - 100$$

Onde XT é a média de crescimento das plântulas tratadas e XC a média de crescimento das plântulas controle.

Deteccção de produtos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A adição de reagentes que interagem com grupos químicos, gerando um padrão de coloração conhecido, é um processo de deteção que permite identificar a presença de grupos químicos de substâncias, sendo caracterizado por ser simples, de rápida execução e baixo custo. Esse procedimento muitas vezes é feito após a CCD, o solvente é evaporado e os compostos separados são detectados por meio de métodos químicos e físicos. Quando as substâncias não são coloridas, é borrifado ou feita a imersão em um reagente químico capaz de produzir cor com os componentes (Ferri, 1996).

Para este fim, foram usados os reagentes: (Wagner & Blatt, 1996)

- Solução de Anisoaldeído, sendo um revelador geral, para quando não se sabe a classe dos compostos;
- Revelador NP/PEG, deteção de flavonoides e outros compostos fenólicos;

Identificação de produtos por CG-EM.

Para aplicação das frações em CG-EM as frações foram diluídas a concentração utilizada de 0,25 mg/mL em acetato de etila para HPLC (J T Baker). Os extratos foram analisados em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) da marca Shimadzu QP2010 Plus usando coluna capilar (30 metros e 100% dimetil polisiloxano) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C por 10 minutos, aumentando 10 °C por minuto até atingir 300 °C que permaneceu por 10 minutos. O detector de massas operou no intervalo de varredura de 40 a 600 Da. Para identificação dos produtos analisou-se o padrão de fragmentação dos produtos e comparou-se com a biblioteca do equipamento e referências na literatura.

Análises estatísticas

Analisou-se a inibição ou estímulo causados nas partes aéreas e radiculares das espécies-alvo, além de diferenças na germinabilidade e tempo médio de germinação em relação ao controle positivo.

As análises estatísticas foram baseadas em testes paramétricos e não-paramétricos, dependendo dos resultados. Para dados paramétricos utilizou-se a análise da variância (ANOVA) comparando-se as médias usando o teste de Tukey a 5%. Já para os dados não-paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis comparando-se as médias usando o teste de Dunn a 5% de probabilidade. Os dados foram considerados não paramétricos após tentativa de normalização dos mesmos sem sucesso.

Para verificar a diferença estatística na germinabilidade, utilizou-se intervalos de confiança (IC), o IC fornece um intervalo de valores plausíveis para o parâmetro baseado nos dados amostrais. Para determinar o IC de um n de 40 sementes utilizaram-se as tabelas científicas de p , com um IC de 95%. (Geigy 1965).

3.5. Resultados e Discussão

Os resultados do bioensaio preliminar dos extratos de folhas de *P. torta*, obtidos pelos solventes orgânicos, podem ser visualizados na Figura 19 (parte aérea) e Figura 20 (parte radicular).

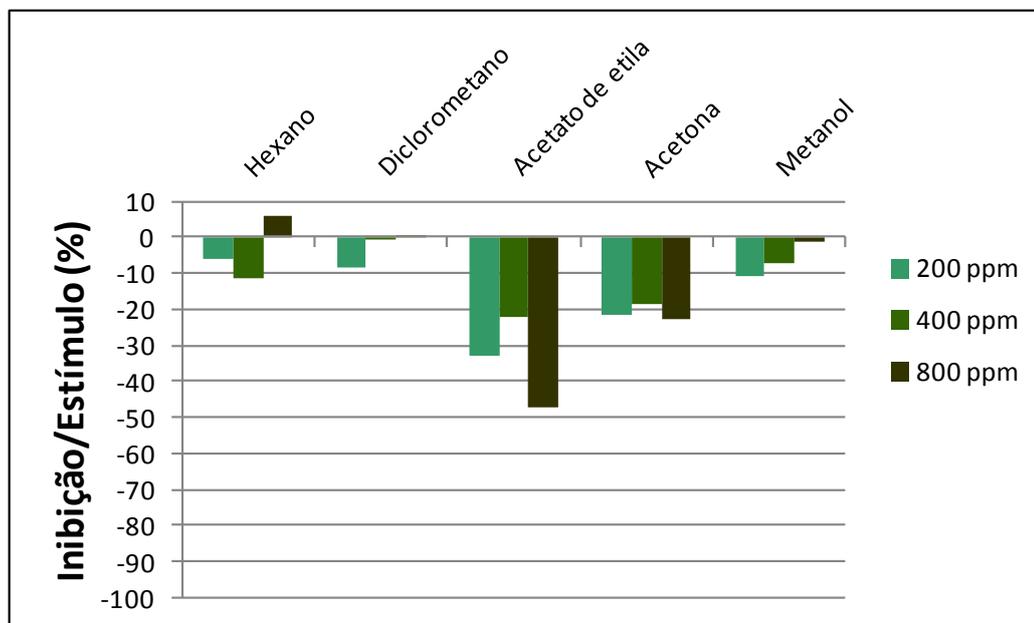


Figura 19. Bioensaio preliminar: porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante sete dias em soluções obtidas a partir dos extratos brutos de folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk preparados com solventes de diferentes polaridades em sistema de Ultrassom, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$. (Dados Allem et al, 2009)

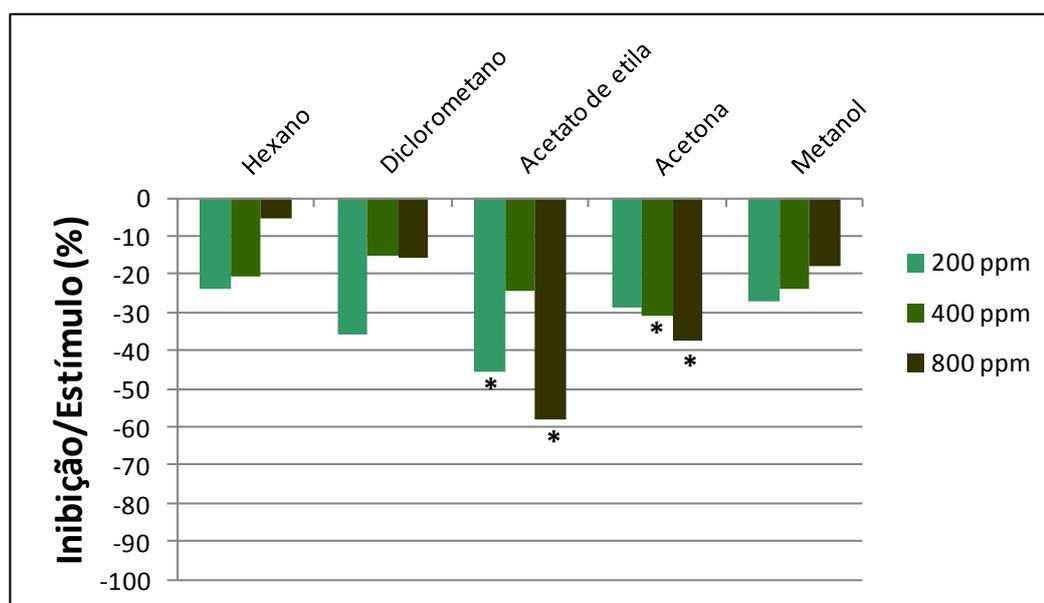


Figura 20. Bioensaio preliminar: porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante sete dias em soluções obtidas a partir dos extratos brutos de folhas de *Pouteria torta* (Mart.)

Radlk preparados com solventes de diferentes polaridades em sistema de Ultrassom, em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$. (Dados Allem et al, 2009)

O extrato que apresentou maior atividade foi o extrato obtido pelo solvente acetato de etila. No crescimento da parte aérea esse efeito não foi diferente significativamente do controle, já em relação ao crescimento radicular constatou-se diferença estatística do controle nas concentrações de 200 e 800 ppm do extrato de acetato de etila e a 400 e 800 ppm do extrato de acetona. Olguin e colaboradores (2005) analisando o potencial fitotóxico de extratos de *Vernonia tweediana* provenientes dos solventes orgânicos hexano, acetato de etila, constataram a inibição no crescimento da radícula e hipocótilo de plântulas de alface, sendo o extrato de acetato de etila o mais ativo.

A partir de tais resultados fizeram-se duas novas coletas e extrações para o fracionamento do extrato de acetato de etila.

O rendimento obtido com cada solvente durante o processo de extração com o método de Soxhlet e com o método de extração exaustiva com Ultrassom pode ser visualizado na Figura 21, para as extrações foram utilizadas 80 e 400 g de folhas respectivamente.

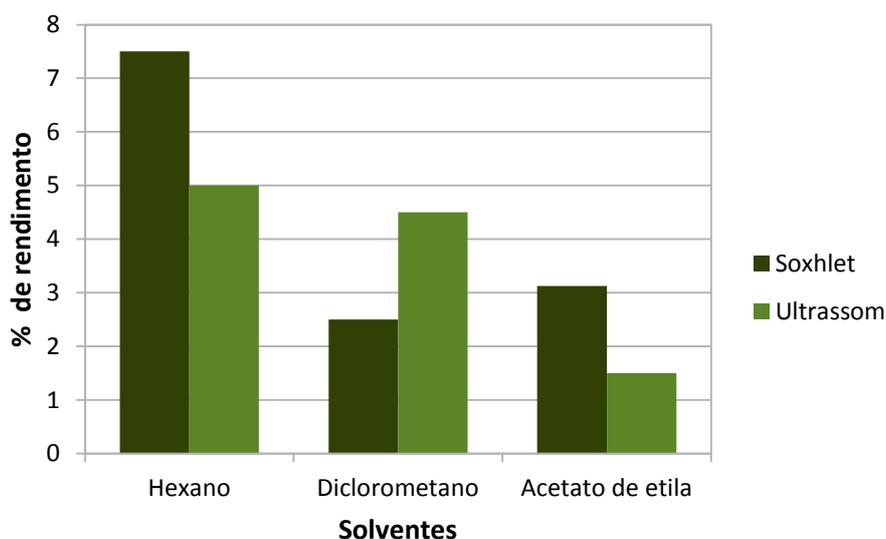


Figura 21. Rendimento dos extratos brutos de hexano, diclorometano e acetato de etila pelos métodos de extração com Soxhlet e Ultrassom a partir de folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

Com ambos os métodos de extração o maior rendimento foi o do extrato obtido de hexano. Esse solvente extrai compostos apolares como as ceras e lipídeos (Falkenberg *et al*, 2003, Ferri, 1996). Conforme Cechinel Filho & Yunes (1998) esse solvente também pode extrair esteroides e terpenóides. O extrato obtido por diclorometano foi o segundo com maior rendimento pelo método de extração com o Ultrassom e o com menor rendimento com o método de Soxhlet. Quando observado o extrato obtido por ultrassom em CCD pode-se

verificar que alguns produtos contidos no extrato de hexano ainda persistem no extrato de diclorometano, o que é menos recorrente com o extrato obtido por Soxhlet. Isso pode ter acontecido em decorrência da renovação do solvente que é obtida pelo sistema de Soxhlet, que aumenta a eficiência da extração. Sendo que a primeira extração, com hexano, foi mais efetiva pelo método de Soxhlet, justifica-se assim o maior rendimento do extrato de diclorometano na extração com Ultrassom.

Produtos como lignanas, flavonoides, sesquiterpenos, triterpenos, lactonas e cumarinas podem ser obtidos do extrato de diclorometano (Cechinel Filho & Yunes; 1998).

Com a extração por Soxhlet, o extrato de acetato de etila foi o segundo com maior rendimento e o obtido por ultrassom foi o de menor rendimento. Podem ser encontrados flavonoides, cumarinas, taninos, xantonas, ácidos terpênicos e saponinas nesses extratos (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Falkenberg *et al*, 2003).

O extrato proveniente do solvente acetato de etila foi fracionado com auxílio de coluna de sílica. Da extração por Soxhlet e ultrassom foram obtidas respectivamente 232 e 242 amostras, que após serem analisadas por CCD foram agrupadas em 9 e 8 frações, respectivamente. Constatou-se, após observação das placas de CCD, que os produtos obtidos pelos diferentes métodos de extração têm pouca similaridade, assim as frações obtidas pelo método de Soxhlet e Ultrassom não são equivalentes.

Bioensaios com as frações obtidas com a técnica de soxhlet

Primeiramente, foram realizados bioensaios de crescimento inicial com plântulas previamente germinadas em água destilada sob o efeito das nove frações obtidas pela extração com o sistema de Soxhlet. Como pode ser visto nas Figura 22 e Figura 23 nenhuma das frações apresentou potencial fitotóxico significativo, por vezes tais frações até mesmo estimularam o crescimento inicial aéreo e especialmente o radicular. A fração que mais inibiu o crescimento aéreo foi a F7 a 200 ppm, com inibição de 21,5%, a mesma fração a 800 ppm causou a maior inibição no crescimento radicular, 19,03%.

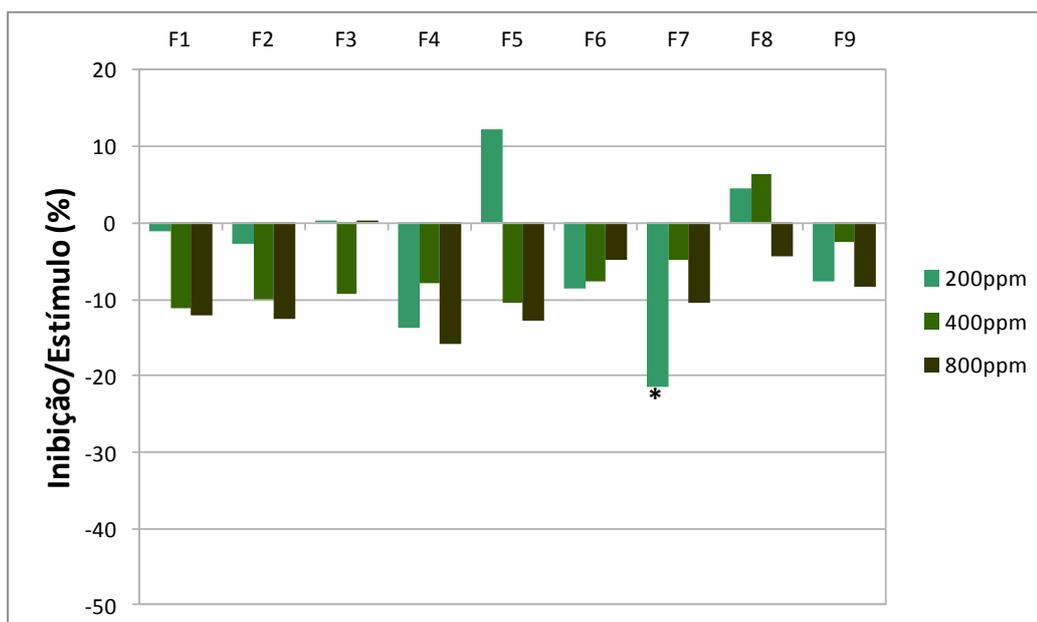


Figura 22. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamim indicum* L. (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração de Soxhlet: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

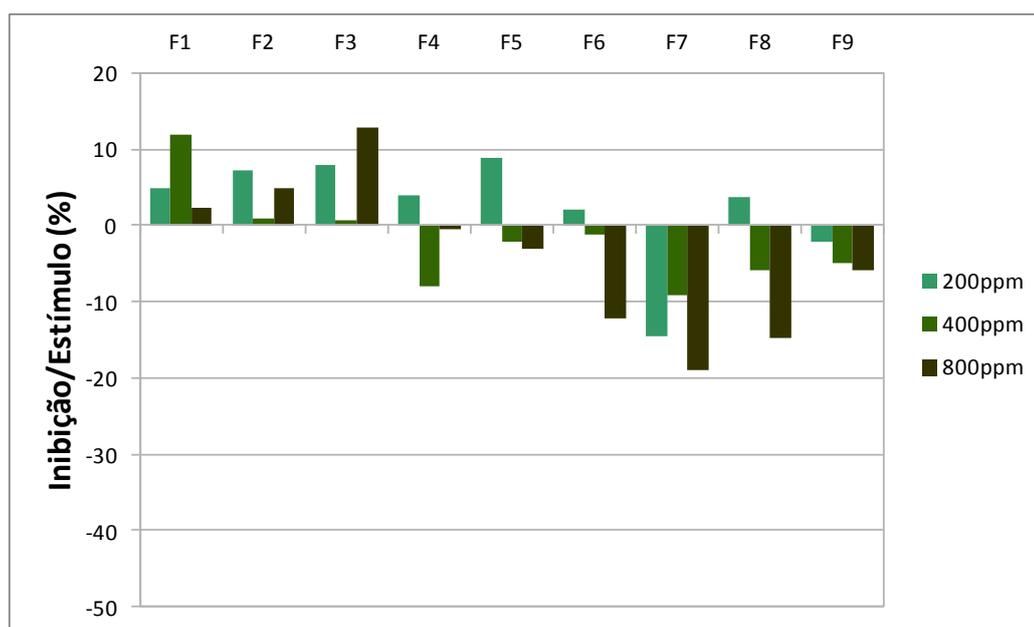


Figura 23. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum. indicum* L.(gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração de Soxhlet: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Pode-se relacionar a pouca atividade das frações com seu método de extração por o extrato obtido ficar por vários dias sob altas temperaturas no sistema de Soxhlet. Métodos de extração com temperaturas elevadas podem apresentar risco de reações químicas, degradando ou modificando produtos que poderiam ter atividade fitotóxica (Ferri, 1996, Maciel *et al*, 2002).

Bioensaios com frações obtidas com a técnica de ultrassom

Considerando que as frações resultantes da extração por Soxhlet não tiveram efeito significativo sobre o crescimento inicial de gergelim partiu-se para bioensaios com as frações do extrato bruto de acetato de etila obtido por extração com Ultrassom. Com tais frações foram realizados tanto bioensaios de germinação como de crescimento com as espécies *S. indicum* e *U. decumbens*.

Efeitos na germinação e no crescimento inicial em um mesmo experimento

A germinabilidade de gergelim não foi afetada nem pelo extrato bruto nem pelas frações, sendo que o maior índice de germinabilidade foi 100% obtido em quase todas as frações (mas não em todas as concentrações) e controle, a menor germinabilidade foi 92,5% nas sementes sob o efeito do EB a 800 ppm. Analisando os intervalos de confiança do controle e dos tratamentos vê-se que os valores se sobrepõe, assim, não mostrando diferença estatística significativa (Figura 24).

Em relação ao tempo médio de germinação das sementes de gergelim, o controle germinou em 33,6 horas, o EB a 800 ppm causou o maior efeito, germinando em 46,7 horas, atrasando a germinação em pouco mais de 13 horas, em relação ao controle (anexos, Tabela 12). Ao analisarmos esse atraso em condições naturais, no campo, podemos concluir que tal efeito não é significativo no estabelecimento da espécie.

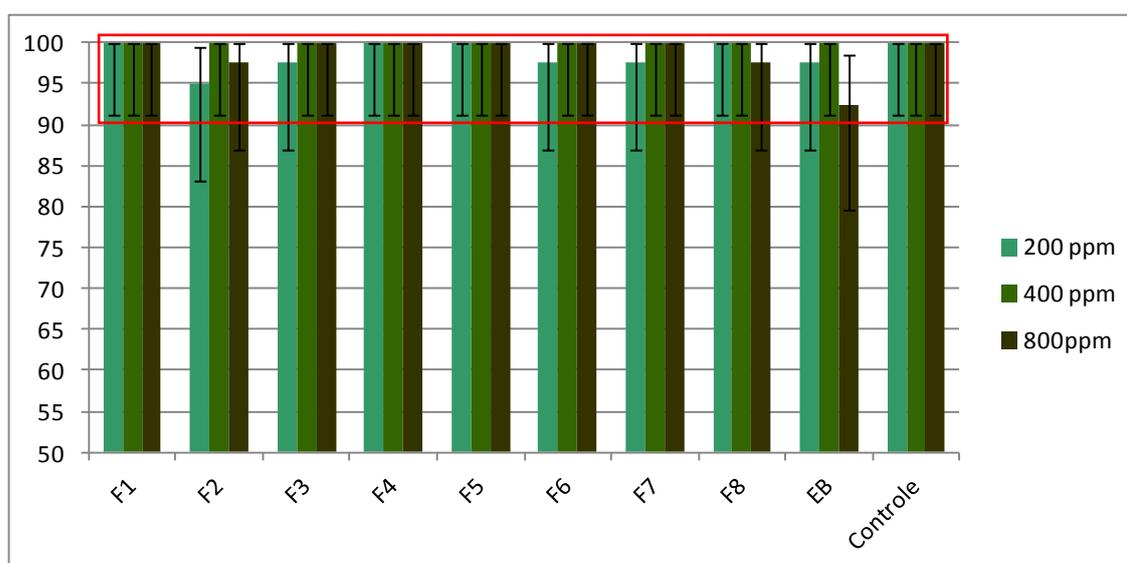


Figura 24. Porcentagem de germinação de sementes de *Sesamum indicum* (gergelim) sob influência do Extrato Bruto (EB) e das frações do extrato de acetato de etila obtido com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3

(F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), controle (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Em braquiária a germinabilidade do controle foi 70%, o maior índice de germinabilidade foi 82,5% foi resultado da ação da fração 5 (F5) a 200 ppm e o menor índice 62,5% (F5 a 400 ppm). Sendo que todos os valores de IC se sobrepõem, não há diferença estatística a 95% de probabilidade (Figura 25).

O tempo médio de germinação da braquiária foi ainda menos influenciado do que o do gergelim, o controle germinou em 47,1 horas, a maior variação em relação ao controle foi de pouco mais de 6 horas em F5 a 800 ppm (53,3 horas) e F8 a 400 ppm (53,4 horas) (anexos, Tabela 13).

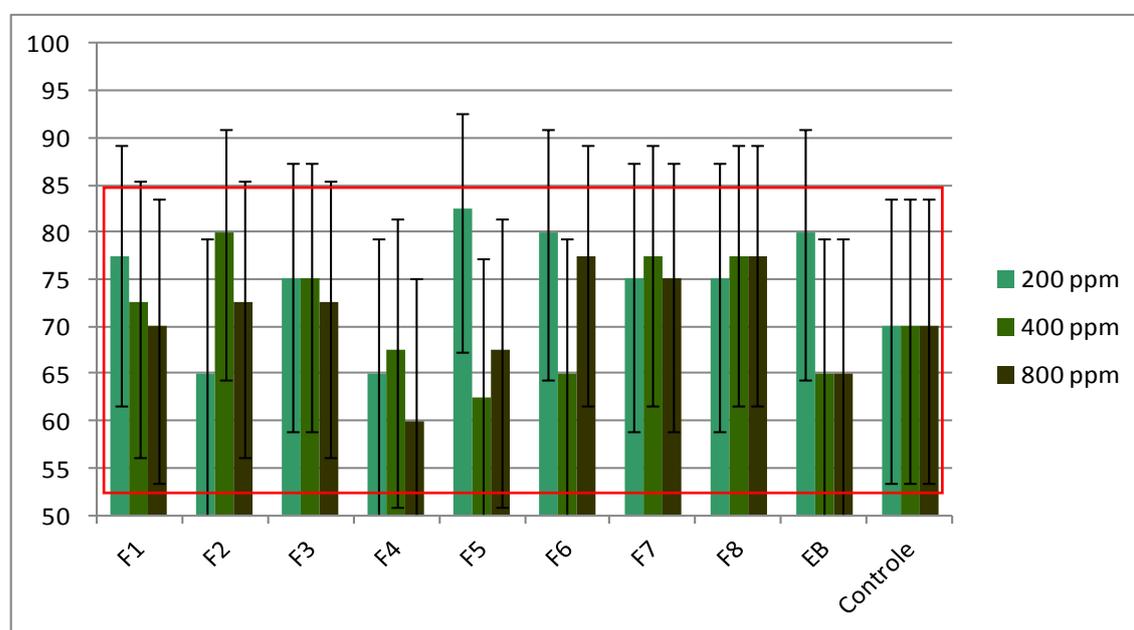


Figura 25. Porcentagem de germinação de sementes *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) sob influência do Extrato Bruto (EB) e das frações do extrato de acetato de etila obtido com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), controle (água destilada). Barras de intervalo de confiança não indicam diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Mais comumente os efeitos dos aleloquímicos são apresentados como inibição do crescimento das plântulas, pois a germinação é menos sensível a tais substâncias (Ferreira, 2004). Outros experimentos com extratos de arbóreas nativas do Cerrado não obtiveram efeito sobre a germinação de espécies-alvo, Pina e colaboradores (2009), aplicando extratos foliares de *Eugenia dysenterica* não encontraram efeito na germinação de sementes de gergelim. Extratos metanólicos de folhas e caule de *Annona crassiflora* e *Annona coriacea* também não apresentaram efeitos sobre a germinação de alface, assim como extratos aquosos de *Aspidosperma tomentosum* (Formagio et al, 2010).

Mesmo sem efeitos dos aleloquímicos na germinação das espécies-alvo não se pode deixar de observar que o uso de gergelim torna os resultados aparentemente mais uniformes, enquanto que o uso da espécie invasora (braquiária) resulta em respostas mais irregulares.

Sementes do gênero *Urochloa* apresentam limitações na germinação, estando dormentes após a sua dispersão sendo os principais fatores que contribuem para esta ocorrência, as causas físicas e fisiológicas. Esta característica evita que a semente germine logo depois de dispersa, sendo uma estratégia para conquistar novos territórios, caracterizando uma espécie invasora (Herrera, 1994; Hessel *et al*, 2012).

Analisando a Figura 26 pode-se observar que o EB causou maior efeito sob o hipocótilo das plântulas de gergelim. Apontaram-se diferenças estatísticas em relação ao controle todas as concentrações do EB, sendo que a 400 e 800 ppm houve a maior atividade inibitória, 28,18 e 28,13%. A fração 5 que a 800 ppm provocou inibição de 20,54% também diferiu estatisticamente do controle. Os extratos F1 e F2 a 400 ppm causaram um pequeno estímulo no crescimento do hipocótilo.

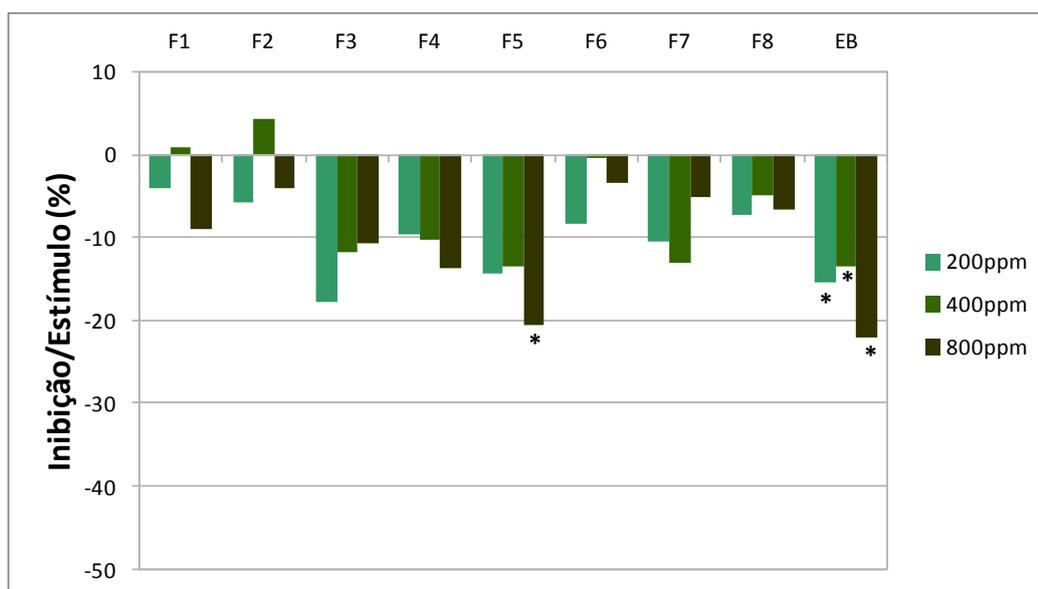


Figura 26. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Como o ocorrido no hipocótilo, o EB e F5 causaram as maiores inibições na parte radicular. Apenas F5 a 800 ppm que inibiu 30,75% teve diferença significativa em relação ao controle, o EB a 800 ppm inibiu 30,23%. A fração 3 a 400 ppm e F7 a 200 ppm causaram ligeiros estímulos à radícula, em ambos os casos menores que 10% (Figura 27).

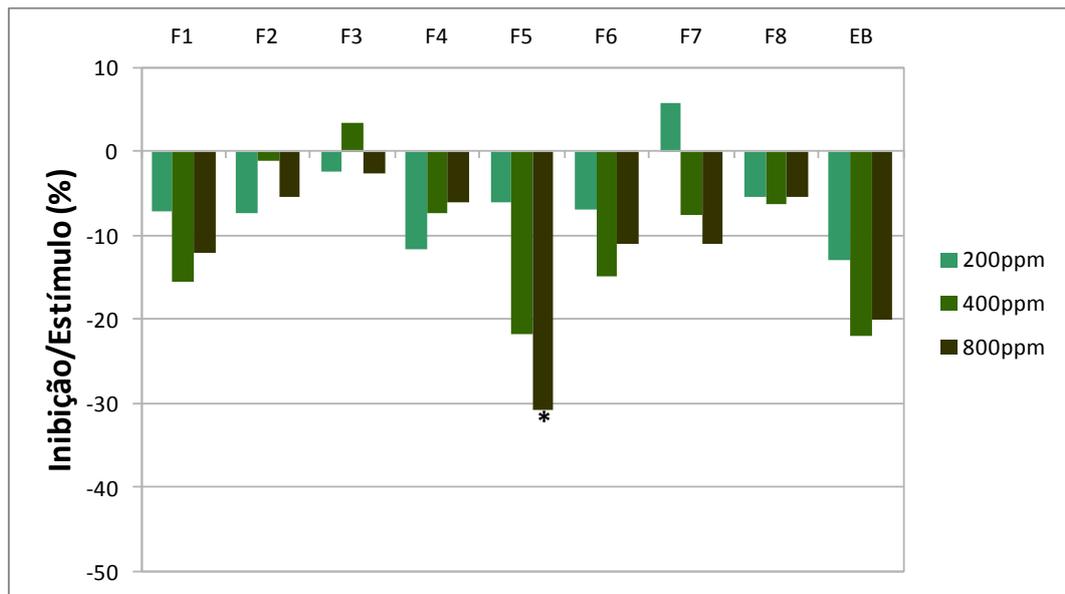


Figura 27. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Diferentemente das respostas do gergelim no bioensaio com a braquiária pode-se destacar a baixa atividade do EB, que chega até a causar um pequeno estímulo a 400 ppm e também a atividade da F1 que estimulou o crescimento aéreo das plântulas em até 19,31% a 400 ppm. As inibições mais estatisticamente significativas ficaram por conta F8 a 800 ppm 34,41%, F5 400 e 800 ppm, 26,32 e 27,57% respectivamente, além de F3 a 400 ppm que causou uma inibição de 25,31%. Mesmo que F6 e F7 em algumas concentrações tenham alcançado boa atividade seu desvio padrão foi alto, justificando assim não diferirem estatisticamente do controle (Figura 28).

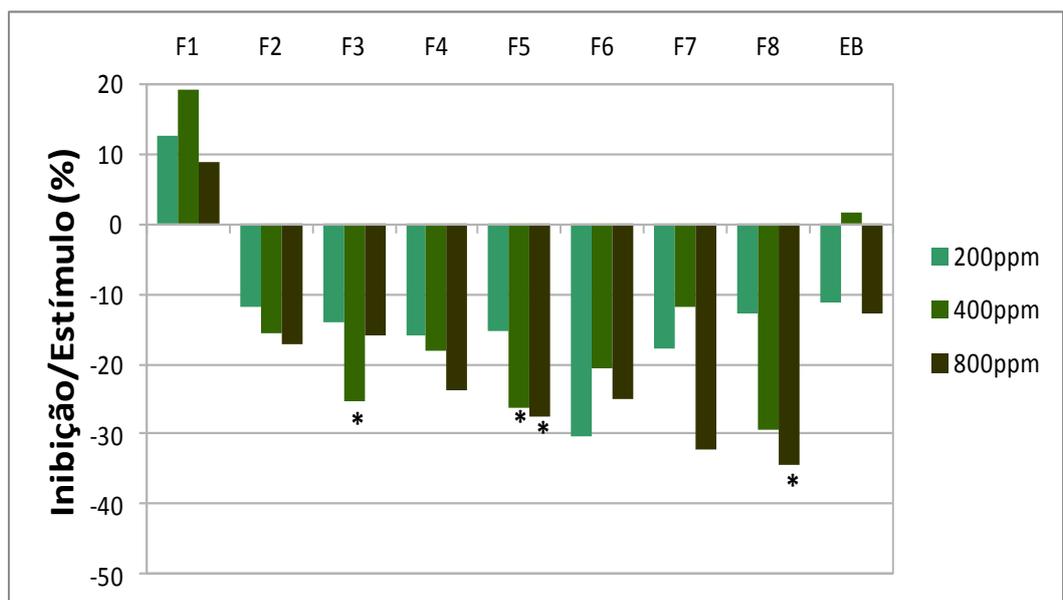


Figura 28. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster

(braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Os resultados obtidos na parte radicular de braquiária estão próximos do que foi encontrado na parte radicular de gergelim. Como tal, o maior efeito inibitório, mesmo tendo diferença estatística do controle, deu-se pelo EB a 800 ppm, 30,09%, seguido de F5 a 800 ppm, 22,11%. F1 a 400 ppm manteve sua atividade estimulatória, aqui com um percentual de 8,74% (Figura 29).

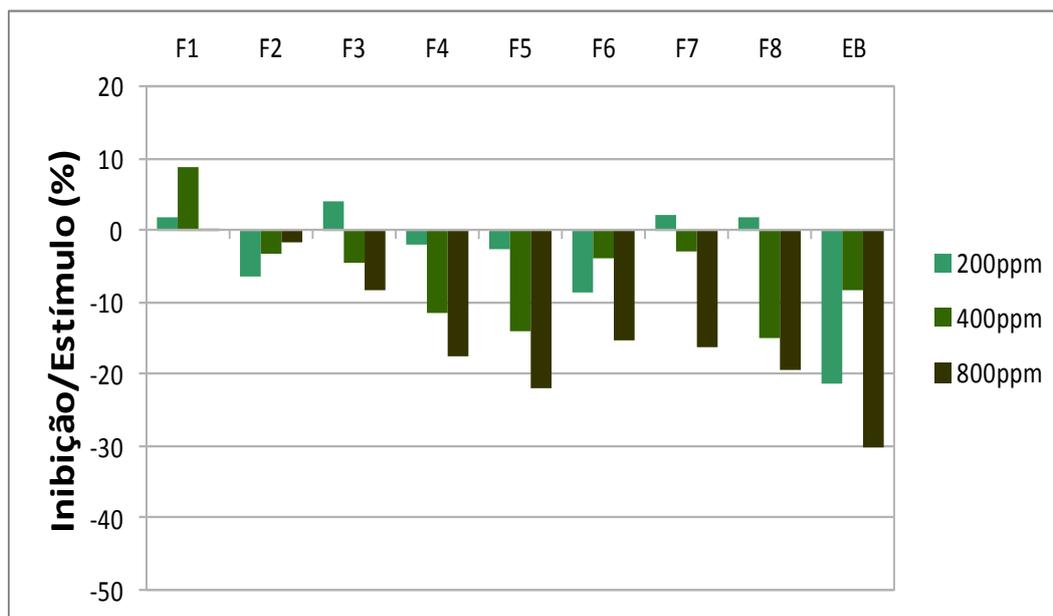


Figura 29. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) germinadas e crescidas durante sete dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Efeitos na germinação e no crescimento inicial em experimentos separados

Com o propósito de separar as respostas fisiológicas da germinação e do crescimento inicial, os bioensaios com gergelim e braquiária foram repetidos, entretanto para os bioensaios de crescimento inicial foram utilizadas sementes previamente germinadas em água destilada.

Quanto aos efeitos no crescimento inicial de sementes de gergelim, na Figura 30 (parte aérea) observa-se que apenas F6 causou estímulo nas três concentrações testadas, sendo a maior a 400 ppm (13,14%), para a radícula. O EB a 800 ppm continua apresentando maior atividade, no hipocótilo, 32,73%, seguido de F4 a 400 ppm, 20,30% e F8 a 800 ppm 19,81%. Além dos extratos com maior atividade F5 a 400 ppm e F4 a 800 ppm também diferiram estatisticamente do controle.

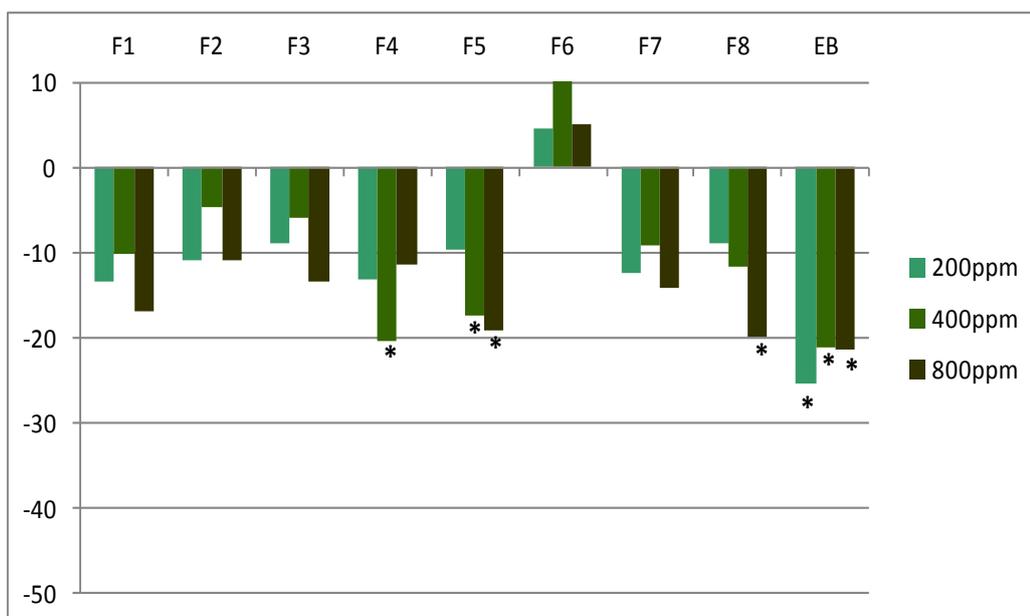


Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Na radícula o EB mostra-se mais efetivo, a 800 ppm inibiu 30,10%, 400 ppm, 25,76%, e a 200 ppm, 28,96% (Figura 31). Além do EB, F8 a 400 ppm (26,86%) e F4 a 800 ppm (15,06%) mostraram-se diferentes estatisticamente do controle. F7 mesmo apresentando inibição perto de 20% não apresentou diferença estatística por ter um alto desvio padrão.

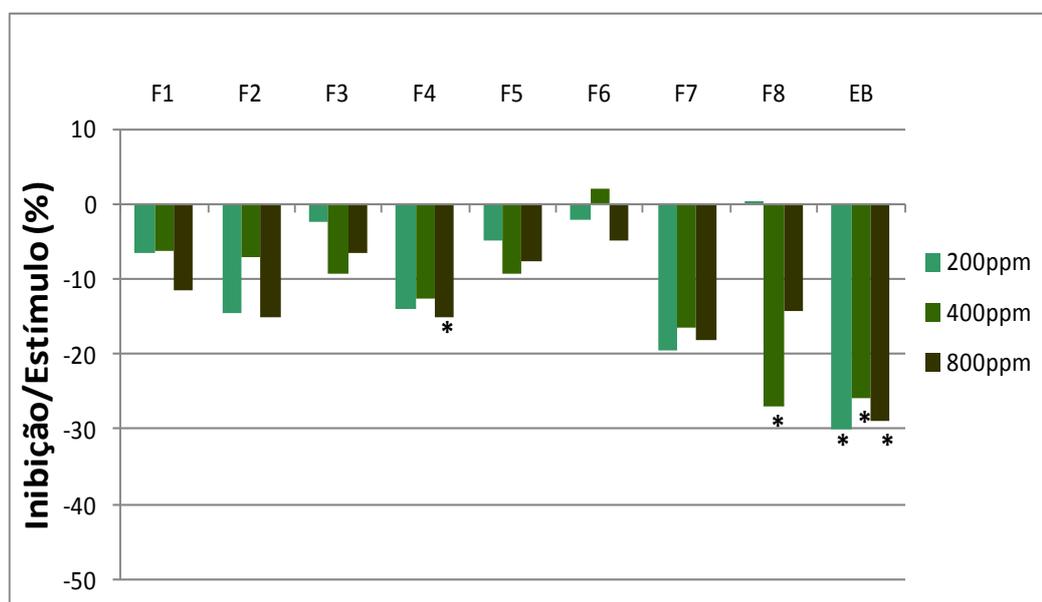


Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Vê-se na Figura 32 onde são apresentados os efeitos na parte aérea de braquiária, que o EB a 800 ppm provocou uma inibição de 33,30%, a 400 ppm, 27,84% e a 200 ppm 24,89%. Ainda, F4 800 ppm esteve entre as maiores inibições 20,67%.

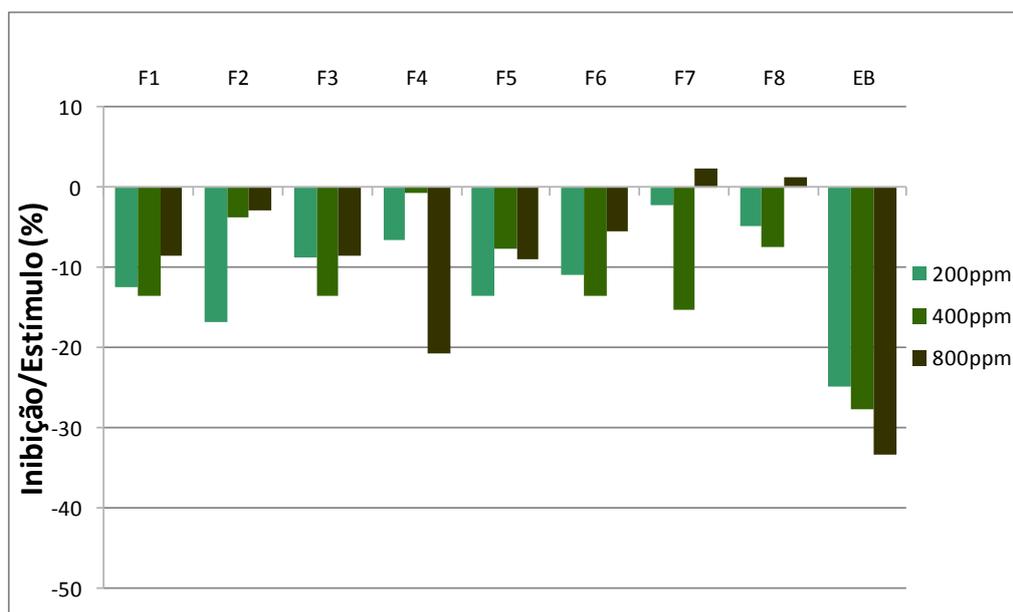


Figura 32. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

Na radícula a inibição mais efetiva foi com o EB a 400 ppm inibindo 50,45%, a 800 ppm 48,75%, e a 200 ppm, 34,99% (Figura 33). Outras frações mostraram-se com boa atividade na radícula como F2 400 ppm (31,72%) e F1 a 200 e 400 ppm (31,55 e 30,88%), todas essas frações tiveram diferença estatística em relação ao controle. F4 a 400 ppm mesmo apresentando uma das maiores inibições, 40,69%, não foi significativamente diferente do controle por ter alto desvio padrão.

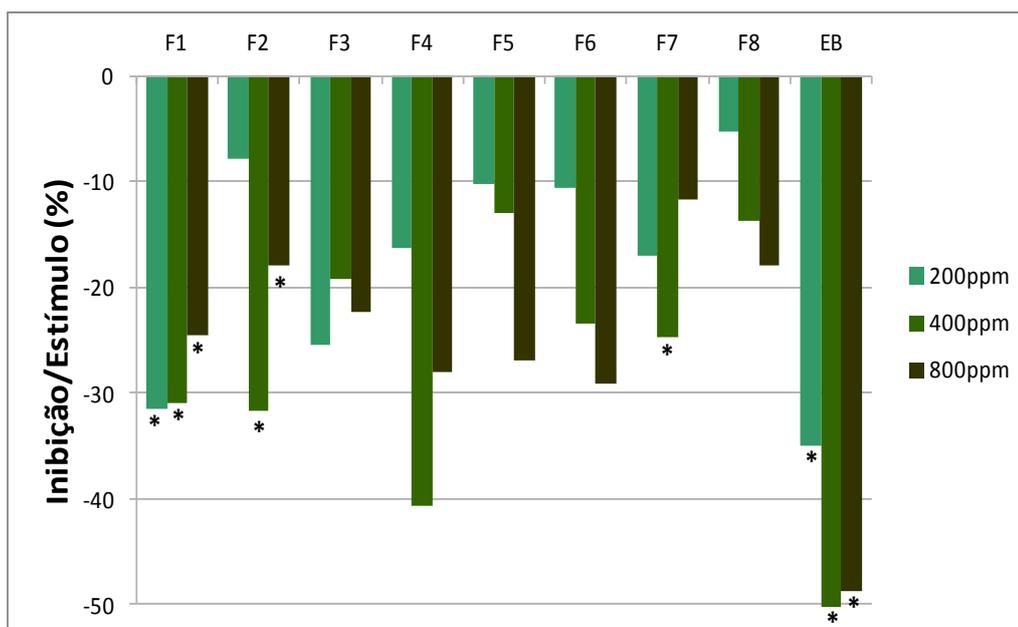


Figura 33. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (braquiária) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, com método de extração com Ultrassom: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8) em comparação com o controle positivo (água destilada). *Indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$

O EB foi que teve maior atividade em praticamente todos os bioensaios, apenas não teve maior destaque no hipocótilo de braquiária do bioensaio em que se analisou o crescimento juntamente com a germinação.

Sendo o EB uma junção de todas as frações, tal resultado aponta para um efeito sinérgico, onde os produtos, uma vez separados, apresentam-se menos ativos. Sinergismo denomina-se o efeito aditivo, multiplicativo ou até exponencial que a presença de duas ou mais substâncias tem, quando agem sobre um fenômeno de maneira combinada. A ação de uma das substâncias é potencializada pela presença de outra (Ferreira, 2005). Mesmo sendo mais comum a maior atividade de substâncias isoladas, o sinergismo tem ocorrido frequentemente em trabalhos envolvendo alelopatia, fitotoxicidade ou estudos medicinais. Rezende e colaboradores (2011), analisando a fitotoxicidade de extratos de *Caryocar brasiliense*, encontraram maior efeito do extrato bruto metanólico do caule quando comparado às frações obtidas do mesmo extrato. Santos e colaboradores (2008) testaram a atividade de duas substâncias isoladas de *Brachiaria brizantha* cv. Mandacaru na germinação e no crescimento de *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, os autores verificaram um efeito sinérgico das duas substâncias, sendo que tanto na germinação como no crescimento das espécies-alvo quando testadas isoladamente tiveram efeito diminuído em relação ao efeito das substâncias em conjunto.

Ainda, entre os bioensaios com as sementes não previamente germinadas destaca-se a atividade de F5, que apenas não apresentou uma boa atividade inibitória do crescimento aéreo de braquiária.

Nos bioensaios em que se analisou o crescimento separadamente da germinação além do EB, F4 teve uma atividade representativa, não tendo uma das maiores inibições apenas na radícula de gergelim.

Não houve diferença representativa nas inibições do crescimento de gergelim e braquiária, nos bioensaios de crescimento juntamente com a germinação, não apontando que uma espécie seja mais sensível que a outra. Já no bioensaio onde se analisou separadamente o crescimento pode-se observar uma maior inibição na braquiária, especialmente na radícula, onde todas as frações tiveram um efeito mais consistente.

Ao analisarmos as espécies entre si nos dois bioensaios, vemos que o percentual de inibição, tanto da parte aérea como radicular, de gergelim manteve-se próximo, não apontando que a espécie seja mais sensível antes ou após a germinação. Já os efeitos em braquiária foram mais discretos, quando se aplicaram os produtos em sementes não previamente germinadas, apontando que quando em contato, após a germinação, com agentes fitotóxicos a espécie torna-se mais sensível a seus efeitos.

Assim, para gergelim verifica-se que não há diferença se a metodologia do bioensaio empregar sementes previamente germinadas ou não, já para braquiária, o resultado foi mais bem expresso com sementes pré-germinadas. Pode-se concluir que diferentes espécies-alvo, podem ter diferentes padrões de resposta aos agentes fitotóxicos, o que requer testes preliminares para se determinar a melhor metodologia a ser aplicada.

Diferentemente do encontrado nesse trabalho, outros autores conseguiram resultados mais significativos com extratos de *P. torta*. Guimarães e colaboradores, 2008, testaram extratos aquosos de folhas trituradas da espécie e independentemente de serem frescas ou secas, encontraram inibição significativa no crescimento radicular de gergelim (>50%), porém não houve inibição significativa no crescimento do hipocótilo. Ainda, Nascimento *et al* (2007) testaram o potencial fitotóxico de extratos aquosos de folhas verdes e senescentes de *P. torta*. Apenas os extratos de folhas verdes tiveram atividade diminuindo a germinação de sementes de alface. Em relação ao crescimento inicial das plântulas, tanto os extratos de folhas verdes como extratos de folhas senescentes foram inibitórios. Ainda, foram testadas soluções com cinzas de folhas verdes e senescentes de *P. torta*, a solução com cinzas das folhas verdes estimularam o crescimento de alface. Nesse trabalho a porcentagem de inibição do crescimento inicial das plântulas chegou a 72.1%. Condessa (2011) testou extratos foliares aquosos e hexânicos de *P.*

torta em alface e tomate. Com ambas as espécies-alvo a inibição foi mais significativa com extratos aquosos, chegando a 74% no alongamento radicular de tomate. O extrato hexânico teve a inibição máxima de 35% na radícula de alface, em tomate as inibições não foram significantes.

O que pode ter ocasionado resultados mais promissores nos trabalhos de Guimarães *et al* (2008) e Nascimento *et al* (2007) é a metodologia de obtenção dos extratos, em ambos os extratos são aquosos, enquanto que no presente trabalho os extratos são obtidos pelo solvente orgânico acetato de etila. Tal hipótese pode ser reforçada pelos dados encontrados por Condessa (2011), onde inibição mais consistente foi obtida com extratos aquosos, ainda, as porcentagens de inibição encontradas por extração com o solvente orgânico hexano são próximas às encontradas nesse estudo.

Metodologias distintas podem extrair compostos diferentes ou em diferentes quantidades, ocasionando a discrepância de dados obtidos mesmo que os estudos sejam com a mesma espécie e com a mesma parte da mesma, no caso as folhas. Contudo, mesmo havendo produtos que causem inibições significativas nos extratos testados nesse estudo aponta-se que as substâncias com maior atividade fitotóxica são mais polares e podem ser extraídas com solventes de maior polaridade e a água.

Identificação dos produtos.

Na análise de CCD por técnica colorimétrica em resposta aos reagentes anisoaldeído e NP/PEG, pode-se observar compostos fenólicos originados do ácido clorogênico em todas as frações, pois quando observadas em luz ultravioleta (365 nm) apareceram manchas que emitiram fluorescência verde-azulada característica.

Vindo a encontro com os resultados obtidos, foram identificados derivados de ácido clorogênico em extratos foliares das espécies *Ilex paraguariensis*, *Ilex theezans*, *Ilex dumosa*, *Campomanesia xantocarpa*, *Capsicodendrum dinissi* e *Prunus sellowii* analisados em CCD (Valduga *et al*, 1997).

Ácidos fenólicos e flavonóides estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais e freqüentemente são associados a fenômenos alelopáticos. Ácidos fenólicos são mencionados como responsáveis pela redução de absorção de micro e macronutrientes em diversas espécies, como exemplo, o ácido clorogênico que pode alterar o balanço de nutrientes nas plantas (Santos & Rezende, 2008).

Santos & Rezende (2008) testaram o efeito dos ácidos fenólicos, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e de uma mistura de todos eles na germinação de *Cassia tora* (mata-pasto), *Mimosa pudica* (malícia) e *Cássia occidentalis* (fedegoso). O ácido clorogênico inibiu cerca de 40% da germinação de malícia e mata pasto, porém a maior atividade na germinação foi alcançada pela mistura dos ácidos, chegando a quase 70% em malícia apontando um efeito sinérgico como o encontrado neste estudo.

Em estudo fitotóxico o crescimento de plantas de milho foi afetado pela presença de frutos maduros de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) ou dos seus extratos, o ácido clorogênico que já havia sido identificado na espécie e foi apontado como um possível agente alelopático causador de tal efeito (Miró *et al*, 1998).

Os efeitos inibitórios verificados nos resultados desse trabalho podem ser justificados pela presença dos derivados do ácido clorogênico sendo que tais produtos têm sido relatados como inibidores do desenvolvimento de espécies vegetais.

Em relação à análise em CG-EM, na F1, nos tempos de retenção 28,12 min. e 29,00 min. encontraram-se produtos onde analisando o espectro de massas mostra os sinais referentes à fragmentação de triterpenos do tipo amirina (Figura 34) (Vilegas *et al*, 2007).

A maioria dos triterpenos das séries oleanano e ursano caracteriza-se por apresentarem um pico de base no fragmento $m/z = 218$. A α -amirina e a β -amirina são derivados da série ursano e oleano, respectivamente. Analisando o padrão de fragmentação, a diferenciação entre os esqueletos ursano e oleano pode ser observada na relação de intensidade entre os picos em m/z 203 e m/z 189. Para os triterpenos derivados do esqueleto oleano o fragmento em m/z 203 é mais intenso que em m/z 189, enquanto que para os derivados do esqueleto ursano o que ocorre é o contrário (Ogunkoya, 1981; Geise, 2005; Vilegas *et al*, 2007;). Além dos fragmentos m/z 218 e 189, os fragmentos m/z 135 e 95 foram encontrados por Ercil e colaboradores (2004) no espectro de β -amirina. Dessa forma podemos concluir que a Figura 35 apresenta o padrão de fragmentação da β -amirina ($T_R = 28,12$ min.) e a Figura 36 a α -amirina ($T_R = 29,00$ min.).

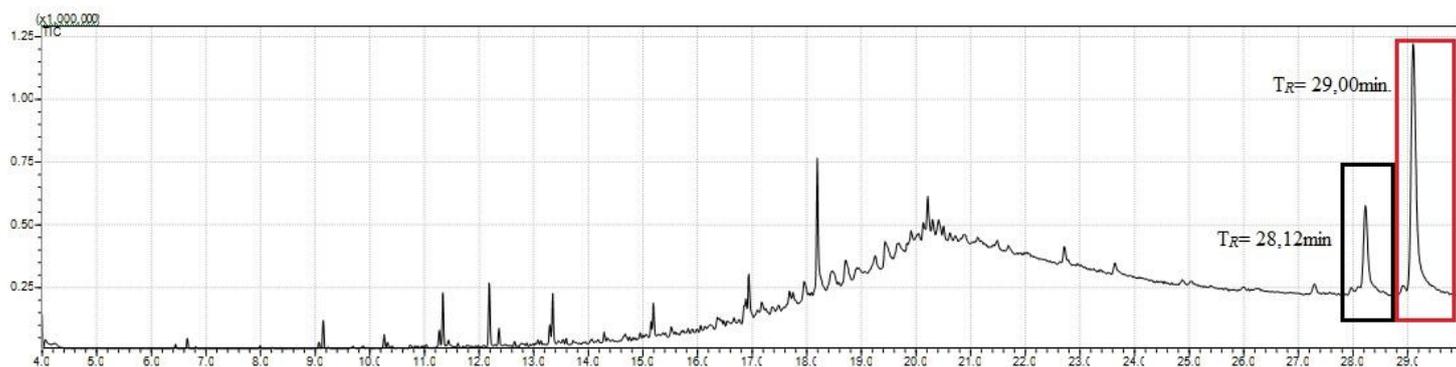


Figura 34. Cromatograma da Fração 1 (F1)

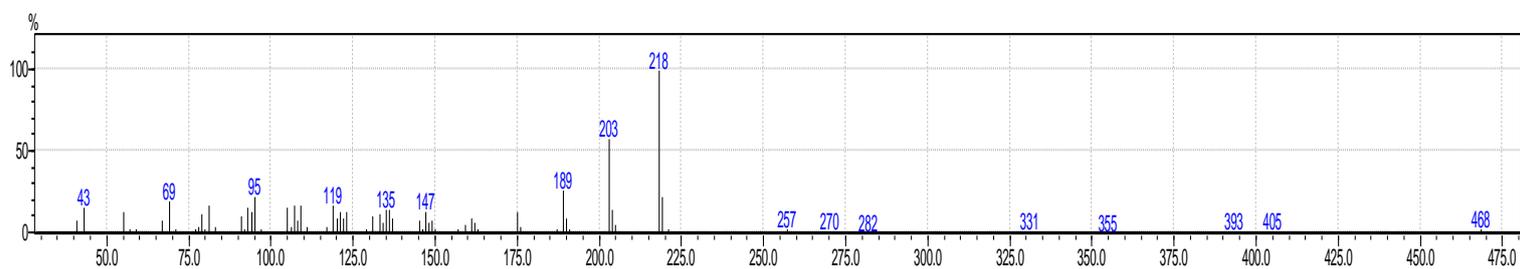


Figura 35. Espectro de massa correspondente ao $T_R=28,12$ min

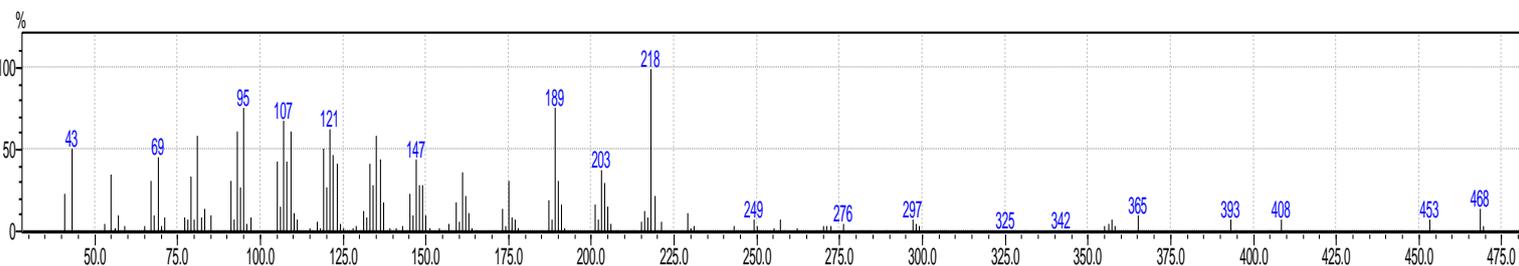


Figura 36. Espectro de massa correspondente ao $T_R=29,00$ min

A α -amirina e β -amirina já foram anteriormente identificadas em folhas, frutos e flores de *P. torta* e em extratos de folhas de *Pouteria gardnerii* (Figura 37) (David, 1993; Lopez, 2005; Silva, 2007). A ocorrência de α e β -amirina foi relatada em extratos de *Hancornia speciosa*, *Protium heptaphyllum*, *Calycorectes psidiiflorus* e *Eschweilera longipes* (Carvalho *et al*, 1998; Bandeira *et al*, 2007; Barros, 2008; Domingues *et al*, 2010;). A α -amirina foi identificada em extratos de folhas de *Solanum lycocarpum* (Oliveira; 2009).

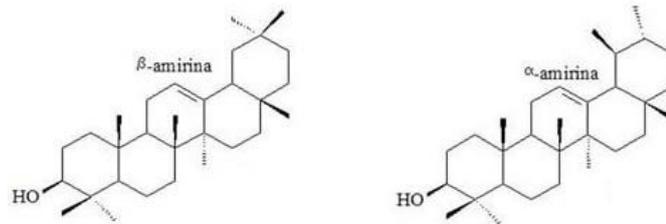


Figura 37. Estrutura de α e β -amirina

Além dos triterpenos α e β -amirina, em *P. torta* já foram encontrados acetato de α e β -amirina, α e β -fiedelinol, acetato de lupeol, ácido betulínico e ácido ursólico (Che *et al*, 1980; Lopez, 2005; Perfeito *et al*, 2005).

Os terpenoides são produtos tóxicos para muitos insetos e mamíferos herbívoros, assim estando relacionados com a defesa vegetal, estes podem ser sintetizados, por exemplo, em resposta a invasão de patógenos (Taiz & Zeiger, 2004; Gleason & Chollet, 2012 a). Inderjit & Duke (2003) apontam os terpenóides e compostos fenólicos como os principais grupos químicos associados à alelopatia. Dessa forma, o efeito inibitório encontrado nesse estudo pode estar ligado a tais produtos.

Ainda, foram encontrados compostos de cadeia longa em todas as frações que se acredita serem ácidos graxos ou seus derivados, sendo que estes estão entre os lipídeos mais comuns nas plantas e têm função de proteção, constituintes das membranas celulares, reserva de energia e ainda são precursores de outros metabólitos (Dewick, 2002).

3.6. Referências

- ALLEM, L.N.; ANDRADE, E.R.; OLIVEIRA, S. C. C.; BORGHETTI, F. Efeitos fitotóxicos de extratos foliares de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. no crescimento inicial do gergelim. 2009. XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.
- BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; COSTA, S.M.O.; SANTOS, H.S. 2007. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 204-208.
- BARROS, I.M.C. 2008. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 194p.
- BLUM, O. 2011. Plant-Plant Allelopathic Interaction. Phase II: Field/Laboratory Experiments. In: BLUM, O. *Plant-Plant Allelopathic Interaction*: North Carolina State University: Springer. p. 86-149.
- BORGHETTI, F., FERREIRA, A.G., 2004. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A.G & BORGHETTI, F. (eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. p.209-222.
- CARVALHO, M.G; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F.B. 1998. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, 21 (6): 740-742.
- CECHINEL FILHO, V., YUNES, A.R., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21(1): 99-105.
- CHE, C.T., KOIKE K.; CORDELL G.A.; FONG H.H.S.; DOBBEHSTETN R.H. 1980. Triterpenes of *Pouteria torta* (Sapotaceae). *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 43: 420-421.
- CONDESSA, B. M. 2011. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 101p.
- DAVID, V. 1993. Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores, frutos e xilopódio de *Pouteria torta*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de São Carlos. 97 p.
- DEWICK, M. P. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2 Ed. John Wiley & Sons Ltd. 2002.
- DOMINGUES, E.A., NAKAMURA, C. V, SOUZA, M.C.; TEIXEIRA, T.S.; PEIXOTO, J.L.B.; SARRAGIOTTO, M.H., VIDOTTI, G.J. 2010. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O . Berg). *Revista Brasileira de Farmacognosia*

20(1): 23-27.

ERCIL, D.; SAKAR, M. K.; DEL OMO, E.; SAN FELCIANO, A. 2004. Chemical constituents of *Linaria aucheri* Turk. *J. Chem.* (28):133-139.

ESPÍNDOLA-DARVENNE, L. S. 2007. Cerrado, fonte de descoberta de novos medicamentos. *Brasilia Médica.* (44)3: 193-198.

FALKENBERG, B. M., SANTOS, I., SIMÕES, O.M. 2003. Introdução da análise fitoquímica. In: SIMÕES, O. M. C. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2003. p.229-244.

FERREIRA, A.G. 2004. Interferência, competição e alelopatia. In: FERREIRA, A.G & BORGHETTI, F. (eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. p.251-262

FERREIRA, A.G. 2005. Alelopatia: sinergismo e inibição. In: R.J.M.C. Nogueira, D.E. Araújo, L.G. Willadino, U.M.T. Cavalcante (eds.). *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*, Imprensa Universitária, UFPE, Recife, p. 433-440. 2005.

FERRI, H. P., 1996. Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: STASI, C. L., (Eds). *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência*. São Paulo: Editora Unesp. 1996. p.129-156.

FORMAGIO, N.S., MASETTO, E.T., BALDIVIA, S.D., VIEIRA, C.M., ZÁRATE, H.A.N., PEREIRA, V.Z. 2010. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Biociências* (8)4: 349-354.

GEIGY, J.R. 1965. Limites exactos de confianza para *p*. In: GEIGY, J.R. *Tablas científicas*. Espanha: J.R. Geisy S.A. Basilea (Suiza). 6ed. 1965. p.783.

GIESE, S. O. 2005. Estudo da Composição Química dos Óleos Florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae). Dissertação de Mestrado. Pós graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. 67p.

GRISI, P.U.; RANAL, M.A.; GUALTIERI, S.C.J. & SANTANA, D.G. 2012. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34(1):1-9.

GUIMARÃES, E. S. L., MOTTA, M.C.F., BORGHETTI, F. 2008. Efeitos alelopáticos de folhas inteiras e trituradas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk sobre o desenvolvimento inicial de *Sesamun indicum* L. IX Simpósio Nacional Cerrado.

HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; MORAIS, S.A.L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D.Q.; NASCIMENTO E.A. & CHANG, R. 2007. Estudo fitoquímico e alelopático do extrato de caule de Sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*). *Planta Daninha* (25)4: 755-762.

HERRERA, J. 1994. Efecto de algunos tratamientos para interrumpir el reposo en semillas de pastos. II. *Brachiaria decumbens*. *Agronomia Costarricense* (18)1: 75-85.

- HESSEL, C. L. E.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. ; PEDÓ, T. 2012. Mesa densimétrica e qualidade fisiológica de sementes de brachiária. *Informativo Abrates*, (22) 73-76.
- INDERJIT, OLOFSDOTTER, M., STREIBIG, J.C. 2001. Laboratory bioassay for phytotoxicity: an example from wheat straw. *Agronomy Journal* 93: 43-48.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, C.A., VEIGA JR, F.V., GRYNBERG, F.N., ECHEVARRIA, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* (25)3:429-438.
- MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesq. Agropec. bras.* (33)8: 1261-1270.
- NASCIMENTO, M.C., ALCANTARA S.F., HADDAD, C.R.B., MARTINS, F.R. 2007. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. *Allelopathy Journal* (20)2: 279-286.
- OGUNKOYA, L. 1981. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry* (20): 121-126.
- OLGUIN, C.F.A; HAMERSKI, L.; PERCIO, M. F.; SOMENSI, A. 2006. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. *Revista Varia Scientia* (5)10:137-143.
- OLIVEIRA, S.C.C. ; CAMPOS, M.L. 2006. Allelopathic effects of *Solanum palinacanthum* leaves on germination and seedling growth of *Sesamum indicum*. *Allelopathy Journal* (18): 331-338.
- OLIVEIRA, S.C.; FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. 2004. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 401-406.
- OLIVEIRA, S.C.C. 2009. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. Tese de Doutorado. Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. 190p.
- PERES, M.T.L.P.; SILVA, L.B., FACCENDA, O. & HESS, S.C. 2004. Potencial alelopático de espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). *Acta Botanica Brasilica* 18(4): 723-730
- PERFEITO J.P.; SANTOS, M.L.; LOPEZ, K.S.E; PAULA, J.E; SILVEIRA, D. 2005. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. *Rev. Bras. Farmacognosia* 15: 183-186.
- PINA, G.O.; BORGHETTI, F.; SILVEIRA, C.E.S. & PEREIRA, L.A.R. 2009. Effects of *Eugenia dysenterica* leaf extracts on the growth of sesame and radish. *Allelopathy Journal* 23(2).

- REATTO, A.; CORREIA, R.J.; SPERA, T.S.; MARTINS, S.E.(2008) Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. de & Ribeiro, J.F. (Eds.). Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 108-149.
- REZENDE, A.A.G., HERNANDEZ-TERRONES, G.M., REZENDE, C.L.M.D. 2011. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi). *Bioscience Journal* (27)3: 460-472.
- SANTOS, S.; REZENDE, O. O. M. 2008. Avaliação do potencial herbicida de compostos secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens. *Revista Analytica* 32: 72-78.
- SANTOS, L.S., SANTOS, J.C.L., SOUZA FILHO, A.P.S., CORRÊA, M.J.C., VEIGA, T.A.M., FREITAS, V.C.M., FERREIRA, I.C.S., GONÇALVES, N.S., SILVA, C.E. e GUILHON, G.M.S.P. 2008. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha* (26)3: 531-538.
- SILVA, G.B.; MARTIM, L.; SILVA, C.L.; YOUNG, M.C.M.; LADEIRA, A.M. 2006. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Hoehnea* 33(3):331-338.
- SILVA, C.A.M., SIMEONI, L.A., SILVEIRA, D. 2009. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2A): 501-509.
- SILVA C.A.M. 2007. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.). Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 150 p.
- SILVA JÚNIOR, M.C. 2005. *100 árvores do Cerrado-Guia de campo*. Rede de Sementes do Cerrado. 278 p.
- SOCIEDADE INTERNACIONAL DE ALELOPATIA. 2012. Disponível em: <http://www.international-allelopathy-society.org>. Acesso em: 21 out 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3. Ed. São Paulo: Artmed. 2004.
- VALDUGA, E.; FREITAS, R. J. S. de, REISMANN, C. B.; NAKASHIMA, T. 1997. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, (15)1:25-36.
- VILLEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; BILEGAS, W. POZETTI, G. L. 1997. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* (8)5: 529 -538.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2Ed. Springer. 1996.

4. Anexos

Tabela 8. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de *Sesamum indicum* L. sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio.

	Fev. Frio	Fev. Quente	Julho frio	Julho quente	Controle
200 ppm	24,6	28,2	25,2	25,8	26,4
400 ppm	24,6	28,2	25,8	25,8	26,4
800 ppm	24,6	24,0	27,0	25,8	26,4
1600 ppm	28,5	24,6	24,6	24,0	26,4
3200 ppm	24,0	28,2	25,8	25,2	26,4

Tabela 9. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio.

	Fev. Frio	Fev. Quente	Julho frio	Julho quente	Controle
200 ppm	49,8	56,7	51,8	42,7	44,9
400 ppm	48,0	48,7	44,1	44,0	44,9
800 ppm	40,8	49,6	53,7	44,0	44,9
1600 ppm	38,2	42,0	45,2	40,2	44,9
3200 ppm	45,5	38,2	45,7	43,2	44,9

Tabela 10. Desvio padrão do bioensaio de crescimento de *Sesamum indicum* L. sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio e do extrato de acetato de etila.

	Julho Frio		Julho Quente		Fevereiro Frio		Fevereiro Quente		Extrato Bruto	
	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR
200 ppm	0,160	0,901	0,117	0,761	0,182	1,199	0,134	0,877	0,129	0,830
400 ppm	0,115	0,740	0,131	1,003	0,111	1,103	0,130	0,833	0,161	0,957
800 ppm	0,144	1,362	0,143	1,037	0,239	0,849	0,124	1,319	0,164	0,963
1600 ppm	0,166	1,681	0,231	1,086	0,184	1,459	0,182	1,463	0,154	0,979
3200 ppm	0,391	2,037	0,417	1,844	0,248	2,010	0,390	2,042	0,222	1,176

Tabela 11. Desvio padrão do bioensaio de crescimento de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster sob influência dos extratos de folhas coletadas em Fevereiro e Julho, extraídos a quente e a frio e do extrato de acetato de etila.

	Julho Frio		Julho Quente		Fevereiro Frio		Fevereiro Quente		Extrato Bruto	
	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR
200 ppm	0,580	1,244	0,496	1,693	0,620	0,983	0,267	0,824	0,388	1,044
400 ppm	0,309	0,831	0,528	1,500	0,552	1,503	0,523	0,962	0,380	0,700
800 ppm	0,971	2,014	0,721	1,530	0,479	1,161	0,938	1,750	0,236	1,133
1600 ppm	0,647	1,860	0,594	1,504	0,847	1,890	0,603	1,358	0,569	2,146
3200 ppm	0,765	2,389	0,612	2,560	0,719	1,832	0,817	2,528	0,854	2,493

Tabela 12. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de *Sesamum indicum* L. sob influência da fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9 (F9) EB (extrato bruto de AcoEt) e Controle (água destilada).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	EB	Controle
200 ppm	35,4	37,8	32,6	35,4	40,8	33,8	35,0	33,6	43,2	33,6
400 ppm	38,4	37,8	39,0	41,4	44,4	37,8	37,2	34,8	41,8	33,6
800 ppm	35,4	31,3	39,0	32,4	43,2	33,0	36,0	32,6	46,7	33,6

Tabela 13. Tempo médio de germinação (em horas) das sementes de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster sob influência da fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9 (F9) EB (extrato bruto de AcoEt) e Controle (água destilada).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	EB	Controle
200 ppm	45,6	45,2	48,8	51,6	46,5	52,5	47,2	45,6	42,0	47,1
400 ppm	52,1	51,7	46,4	48,0	48,9	50,7	49,5	53,4	42,4	47,1
800 ppm	52,2	49,6	49,6	51,0	53,3	50,3	52,8	50,3	46,1	47,1