Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

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

Laísa Nogueira Allem

Brasília-DF
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

Laísa Nogueira Allem

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

2010

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Francisco Cândido Xavier

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, por todo o encorajamento nos momentos mais difíceis e amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

Sem querer parecer clichê, começo agradecendo a Deus, por ter me dado a oportunidade de me sentir capaz quando estava num momento de descrença ao passar para o mestrado, nunca tendo me desamparado mesmo nos momentos mais difíceis;

Um agradecimento mais que especial a minha mãe, por sempre ter me incentivado e acreditado na minha capacidade, por ser minha inspiração, meu porto seguro, meu bem maior sem dúvida alguma;

A minha irmã Letícia, que apesar de todos os nossos desentendimentos naturais esteve sempre ali, me empurrando pra frente;

Ao meu pai, Antonio Costa Allem, que acho que no subconsciente foi minha influência para seguir nesse caminho, afinal "filho de peixe, peixinho é";

Ao meu orientador, Dr.Fabian Borghetti, por ter acreditado em mim desde o começo aceitando me orientar quando eu me mostrava totalmente perdida e insegura;

À minha querida Sarah, por todos os seus ensinamentos e paciência em sua estadia pelo laboratório de Termobiologia;

Às professoras Inês Sabioni e Dâmaris Silveira pela ajuda fundamental e imprescindível em toda parte química do trabalho;

À Bruna Diniz, por toda ajuda dispensada a mim desde a faculdade;

À Letícia que dividiu casa comigo durante todo esse período, compartilhando do meu mau humor, minhas tristezas e com certeza muitas alegrias também;

Ao estagiário relâmpago Victor, à companheira de laboratório Bruna, às estagiárias Lorena e Isabele e ao técnico Fábio, por todas as vezes que me auxiliaram de alguma forma, e sei que não foram poucas;

À Layse e Fabrícia por toda a ajuda e apoio desprendidos no meu começo, por todas as risadas que demos juntas, não poderia deixar de mencionar nossa ótima viagem à Fortaleza para o Congresso de Fisiologia Vegetal;

À Estela e Anabele que foram companheiras e amigas durante os dias de trabalho no laboratório e fora dele também, dividindo incontáveis momentos de risadas e lágrimas;

Não poderia me esquecer do Leandro, que ralou e suou junto comigo durante os 2 anos de mestrado, um sempre companheiro do outro, e agora estamos terminando mais essa etapa juntos;

A todos os colegas de mestrado e demais pessoas que de alguma maneira contribuíram para minha chegada até aqui, o meu sincero agradecimento!!!

SUMÁRIO

Índice de Tabelas I

Índice de Figuras I

Resumo IV

Abstract V

Introdução Geral VI

Objetivos Gerais XV

Objetivos Específicos XV

Referências Bibliográficas XVI

Capítulo1- Fracionamento e identificação das frações ativas a partir de extratos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)..... 1

Resumo 2

Abstract 3

Introdução 4

Material e Métodos 6

Resultados e Discussão 9

Conclusões 19

Referências Bibliográficas 20

Capítulo 2- Efeitos alelopáticos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) incorporado ao solo no crescimento de quatro espécies alvo 25

Resumo 26

Abstract 27

Introdução 28

Material e Métodos 30

Resultados e Discussão 32

Conclusões 40

Referências Bibliográficas 41

Anexo 46

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Volume dos eluentes utilizados no fracionamento do extrato de folhas de *Caryocar brasiliense* obtido com solubilização em acetato de etila 13

Tabela 2. Rendimento (massa) das frações obtidas através do fracionamento do extrato acetato de etila proveniente das folhas de *Caryocar brasiliense* 14

Tabela 3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de acetato de etila, proveniente das folhas de *Caryocar brasiliense*, para purificação dos compostos 16

Tabela 4. Volume dos eluentes utilizados no fracionamento do agrupamento das frações 5, 6 e 7, provenientes do fracionamento do extrato de acetato de etila das folhas de *Caryocar brasiliense* 17

Tabela 5. Subfrações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do agrupamento das frações 5, 6 e 7, provenientes do fracionamento do extrato de acetato de etila das folhas de *Caryocar brasiliense*, para purificação dos compostos 18

Capítulo 2

Tabela 1. Proporção de solo e triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* nos diferentes tratamentos 30

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Figura 1. Massa (g) obtida com diferentes solventes a partir de 100 gramas de folhas trituradas de *Caryocar brasiliense* Camb 9

Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de S*esamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência dos extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* e do herbicida comercial Glifosato. * Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 10

Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de S*esamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência dos extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* e do herbicida comercial Glifosato. * Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 11

Figura 4. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Caryocar brasiliense*, e herbicida comercial Glifosato: 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).* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 14

Figura 5. 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 *Caryocar brasiliense*, e herbicida comercial Glifosato: 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).* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 15

Capítulo 2

Figura 1. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sorghum bicolor* (sorgo) crescidas durante cinco dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 32

Figura 2. Tratamentos com *Sorghum bicolor*..... 33

Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 33

Figura 4. Tratamentos com *Sesamum indicum*..... 34

Figura 5. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Brachiaria decumbens* (braquiária) crescidas durante sete dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 35

Figura 6. Tratamentos com *Brachiaria decumbens*..... 36

Figura 7. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Tabebuia impetiginosa* (ipê) crescidas durante sete dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. p< 0,05 36

Figura 8. Tratamentos com *Tabebuia impetiginosa*..... 37

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

RESUMO

Todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar aleloquímicos, metabólitos secundários que interferem no metabolismo de outros organismos. Fatores, como o estresse, podem influenciar tanto sua produção pela planta doadora como modificar seu efeito na planta receptora. Para se constatar a ação alelopática, os bioensaios são importantes pois permitem controlar parâmetros para entender melhor os mecanismos que estão interagindo**.** Esse trabalho teve por objetivo fracionar e isolar compostos ativos presentes nas folhas de C*aryocar brasiliense* e determinar efeitos do triturado de folhas incorporado ao solo sobre o crescimento inicial de espécies alvo. Para isolamento de compostos ativos foi realizado extrações seriadas com hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e água. Para bioensaios, gergelim foi a espécie alvo. O extrato obtido com acetato de etila foi o mais ativo. Este foi fracionado através de coluna cromatográfica, gerando nove frações. Destas, cinco apresentaram efeitos inibitórios comparáveis ao herbicida Glifosato. O triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* foi incorporado ao solo nas proporções 0,75%, 1,5% e 3%, e seus efeitos foram testados sobre sorgo, gergelim, braquiária e ipê roxo. Todas as espécies alvo apresentaram redução do seu crescimento em solo com o triturado, sendo que a parte radicular foi mais afetada do que a parte aérea. Foi observado efeito dose-dependente, escurecimento de partes radiculares nas plântulas de sorgo, gergelim e braquiária, e o gergelim se mostrou a espécie mais sensível à ação dos aleloquímicos. Conclui-se que folhas de *C. brasiliense* são potencialmente capazes de produzir compostos alelopáticos, sendo que os mais ativos podem ser extraídos com o solvente acetato de etila.

Palavras-chave: alelopatia, *Caryocar brasiliense*, extratos orgânicos, solo.

Allelopathic activity of extracts and ground leaf of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) on the initial growth of target species and separation of active fractions by column chromatography

ABSTRACT

All plants are potentially able to synthesize allelochemicals, secondary metabolites that interfere with metabolism of other organisms. Factors such as stress can influence both the production of allelochemicals by the donor plant, as well as their effects on the recipient plant. In order to evaluate allelopathic potential of plants, bioassays are important because they allow control parameters to better understand the mechanisms involved in the allelopathic action**.** This study aimed to fractionate and isolate the active compounds present in leaves of *Caryocar brasiliense* and determine the effects of leaves incorporated into the soil on the initial growth of target species. In the search of active compounds we performed serial extractions with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol and water. Extract prepared with ethyl acetate was the most active. This was fractionated by column chromatography, resulting in nine fractions. Of these, five had inhibitory effects comparable to the herbicide glyphosate. Crushed leaves of *Caryocar brasiliense* were incorporated into the soil in the proportions of 0.75%, 1.5% and 3% (w/v), and their effects were tested on sorghum, sesame, brachiaria and ipê. All target species showed a reduction of their growth in soil mixed with ground leaves. The effects were dose-dependent, and the roots were more affected than the shoots. Darkening of root parts was observed in seedlings of sorghum, sesame and brachiaria. Sesame was the most sensitive among the target species. We conclude that leaves of *C. brasiliense* are potentially capable of producing allelopathic compounds, and the solvent ethyl acetate was the most effective to extract active compounds.

Keywords: allelopathy, *Caryocar brasiliense*, organic extracts, soil.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Alelopatia

A Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS, 1996) define a alelopatia como: "A ciência que estuda qualquer processo que envolva metabólitos secundários produzidos pelas plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos". Doravante, será particularmente tratado sobre as interações alelopáticas entre plantas, objeto de interesse do trabalho.

O primeiro registro de alelopatia foi descrito por Theophastus (300 A.C.), um discípulo de Aristóteles, que observou que plantas de grão- de- bico (*Cicer arietinum* L.) não revigoravam o solo como outras plantas, além de afetar o desenvolvimento das plantas invasoras (Rice, 1984).

A alelopatia pode ser confundida com competição, embora possuam conceitos distintos. A competição envolve a eliminação ou redução de algum fator do ambiente, como água, luz, minerais, que é necessário às plantas que partilham o mesmo habitat (Rice, 1979), enquanto a alelopatia é o acréscimo de substâncias no ambiente. Um evento que pode ocorrer nos estudos alelopáticos é a autotoxicidade, que é quando a planta libera substâncias químicas no ambiente, inibindo a germinação das sementes e o crescimento de plantas da própria espécie (Miller, 1996).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários**,** que variam em concentração, localização e composição (Ferreira & Áquila, 2000), e apresentam uma grande diversidade de classes de compostos (Weston & Duke 2003). A produção desses metabólitos secundários pelas plantas é determinada por características genéticas em combinação com fatores ambientais (An *et al*., 2003).

Taiz e Zeiger (2004) classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, que são produzidos em diversas partes das plantas, como folhas, raízes, frutos, cascas e sementes (Alves & Santos, 2002).

Entre as funções desempenhadas pelos metabólitos secundários nas plantas, estão a proteção contra herbivoria e infecção por microorganismos patogênicos, além de poderem funcionar como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes (Taiz & Zeiger, 2004). As estruturas comumente associadas com o acúmulo e/ou liberação de compostos secundários nas plantas são tricomas glandulares, laticíferos, idioblastos, canais de resina e nectários (Duke *et al*., 2000).

O termo “semioquímicos” é utilizado para designar substâncias que mediam interações entre organismos, sendo divididos em dois principais grupos: os feromônios e os aleloquímicos, mediando interações intra-específicas e interespecíficas, respectivamente (Souza Filho, 2002a). Portanto, os metabólitos secundários responsáveis pelo fenômeno da alelopatia são denominados aleloquímicos.

Todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar aleloquímicos (Rezende *et al.* , 2002), e fatores de estresse podem influenciar tanto a produção desses compostos pela planta doadora como modificar seu efeito na planta receptora (Pedrol *et al.*, 2006). De acordo com Einhellig e Leather (1988), a natureza e a quantidade de substâncias alelopáticas diferem com a espécie, a idade do órgão da planta, a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de nutrientes, entre outros fatores.

Para constatar a ação alelopática, os bioensaios têm grande importância, pois através deles consegue-se controlar alguns parâmetros (temperatura, disponibilidade de água, entre outros) para investigar os mecanismos que estão interagindo (Gatti *et al*., 2004**).** Algumas espécies, como *Lactuca sativa* L. (alface) e *Solanum lycopersicum* L. (tomate), são mais sensíveis à ação dos aleloquímicos do que outras, sendo, portanto mais utilizadas como espécies alvo em bioensaios alelopáticos (Ferreira & Áquila, 2000).

1.2 Modos de liberação e de ação

A localização de um aleloquímico nas plantas está relacionado com a facilidade de liberação para o meio e a função que desempenham (Alves *et al*., 2002), sendo liberados no ambiente como uma resposta a fatores de estresse biótico e abiótico (Inderjit & Nielsen 2003) e seus efeitos são dependentes da concentração (Reigosa *et al.*, 1999). A liberação no meio ambiente pode se dar por: volatização, exsudação radicular , lixiviação e decomposição de resíduos (Souza Filho & Alves, 2002).

Os aleloquímicos estão presentes em todos os órgãos das plantas, entretanto a presença desses compostos não é uniforme, variando em função da espécie da planta e do órgão analisado (Wu *et al*., 2000, Periotto *et al*., 2004). Aparentemente a maioria dos aleloquímicos possuem efeitos inibitórios nas plantas atingidas quando estão em altas concentrações e estimulatórios em pequenas concentrações (Rice, 1984).

Segundo Rice (1984), após serem liberados, os compostos podem causar efeitos diretos e indiretos sobre outras plantas, e estes efeitos estão relacionados a processos fisiológicos (Rezende *et al.*, 2002). Efeitos diretos são caracterizados por alterações no metabolismo e crescimento da planta, como divisão celular (Sanches-Moreiras *et al*., 2008;

Iganci *et al*., 2006), fotossíntese (Batish *et al*., 2004; Yu *et al*.,2003) e respiração (Batish *et al*., 2007; Batish *et al*., 2004, Hejl & Koster, 2004). Efeitos indiretos compreendem alterações em propriedades do solo, interferindo na absorção de nutrientes (Abenavoli *et al.*, 2001), como também na população e atividade de microrganismos (Kong *et al*., 2008).

Substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns (Ferreira & Áquila, 2000). O efeito morfológico dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças primárias. Portanto, os efeitos desses compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de efeitos ocorridos inicialmente ao nível molecular e celular (Periotto *et al*., 2004). Alguns exemplos desse tipo de alteração secundária são relatados a seguir.

Oliveira e colaboradores (2004 a) investigando a ação alelopática dos extratos foliares de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (lobeira) sobre *Sesamum indicum* (gergelim), constataram a ausência de pêlos absorventes nas raízes, desenvolvimento incompleto da coifa e uma inversão no gravitropismo das raízes das plantas tratadas. Pina (2008) estudando o efeito do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg (cagaita) sobre *Sesamum indicum* e *Raphanus sativus* L. (rabanete), constatou alterações morfológicas em ambas as espécies, como redução da quantidade média de raízes laterais por plântula, escurecimento dos tecidos radiculares e respostas gravitrópicas alteradas.

A degradação pelos microorganismos desempenha um importante papel na regulação da concentração desses compostos no solo (Reigosa *et al*., 1999). Uma vez introduzidas no ambiente, é necessário que tais substâncias se acumulem em quantidade suficiente para que venham a afetar outras plantas, se mantendo por algum tempo ou sendo liberadas continuamente para que os efeitos sejam persistentes (Almeida, 1988).

Como uma planta produz diversos aleloquímicos, os quais desencadeiam diversas interações entre si, provavelmente a ação de tais substâncias ocorre através da sinergia existente entre elas, o que dificulta identificar qual desses aleloquímicos provocam os efeitos observados nas plantas receptoras (Almeida, 1988).

1.3 Aleloquímicos como defensivos agrícolas

A produtividade dos campos agrícolas é rotineiramente influenciada pela alelopatia, sendo esta vista como um dos mecanismos pelos quais as espécies invasoras interferem no crescimento das plantas cultivadas (Souza Filho, 2002b). Com isso, o abuso de substâncias químicas utilizadas na proteção das culturas gerou vários problemas, como a seleção de

plantas invasoras com genótipos resistentes aos herbicidas e elevado impacto produzido sobre a saúde humana e o ambiente (Macías *et al*, 2003).

As técnicas de isolamento e esclarecimento do modo de ação dos aleloquímicos tem sido utilizados para o desenvolvimento de herbicidas naturais (Iqbal *et al*., 2003), o que em termos de aplicação, é uma das metas mais importantes dos estudos alelopáticos (Macías *et al*., 2000). Segundo Romagni e colaboradores (2000), muitos sítios moleculares de ação vêm sendo observados em certos compostos naturais, os quais não foram observados nos herbicidas disponíveis no mercado.

Como exemplos de estudos comparativos entre a ação de herbicidas sintéticos e de aleloquímicos isolados a partir de plantas, pode-se citar a cinmetilina, herbicida análogo aos monoterpenos naturais 1,4- e 1,8-cineol que causa inibição da síntese da enzima asparagina sintetase (Romagni *et al.*, 2000), e a sorgoleona, *p*-benzoquinona que constitui a maior parte dos exsudados radiculares de sorgo, e age no fotossistema II da cadeia de transporte eletrônico da fotossíntese, similar à herbicidas comerciais como o diuron, atrazina e metribuzina (Nimbal *et al.*, 1996).

Segundo Reigosa e colaboradores (1999), as moléculas sintéticas têm efeitos fortes e tem mais definido um ponto de ação no metabolismo das espécies alvo. Os mais modernos herbicidas comerciais são ativos em baixas concentrações (Duke *et al*. 2001). Contudo, por possuírem modos alternativos de ação, maior especificidade de ação e causarem menos danos ambientais, os produtos naturais são candidatos para o desenvolvimento de novos modelos de herbicidas (Duke *et al*., 1997).

1.4 Bioensaios

Em estudos de alelopatia, os bioensaios são uma ferramenta de grande importância para análise da ação dos aleloquímicos, pois avaliam o potencial alelopático das espécies em estudo, acompanhando assim as respostas durante as fases de extração, fracionamento, purificação e identificação dos compostos (Leather & Einhellig, 1986).

Os bioensaios mais usados para a comprovação alelopática são os testes de germinação e de crescimento das plântulas (Vyvyan, 2002), porém os testes de germinação, em geral, são menos sensíveis do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas (Ferreira & Áquila, 2000). A massa seca da raiz e parte aérea, o comprimento das plântulas (parte aérea e radicular) e a presença de pêlos absorventes são parâmetros bastante usados para se avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento (Ferreira & Áquila, 2000).

Bioensaios de laboratório podem estabelecer se uma planta tem potencial alelopático, mas para se ter a confirmação de que o potencial alelopático observado é expresso em condições naturais são necessários estudos de campo (Inderjit & Dakshini 1995). Embora seja difícil simular as condições exatas de campo em laboratório, podem-se simular condições reais ao máximo possível (Inderjit & Weston, 2000), onde o habitat da planta deve ser considerado ao se montar os bioensaios alelopáticos (Inderjit & Dakshini 1995).

Um exemplo na literatura em que se procurou aproximar os bioensaios com o que ocorre na natureza é o trabalho de Souza e colaboradores (2007), onde foi comprovado que o uso de substrato solo para o crescimento de plântulas é eficaz, mantendo a disponibilidade dos aleloquímicos. Foi constatado que o uso de folhas trituradas de *Campomanesia adamantinum* Camb. O. Berg, *Caryocar brasiliense* Camb, *Eugenia dysenterica e Qualea parviflora* Mart, nas concentrações de 1% e 3% foram suficiente para a observação de efeitos sobre *Sesamum indicum*, mostrando-se tão eficiente quanto o uso de extratos aquosos na comprovação de atividade alelopática.

1.5 Identificação dos aleloquímicos

O isolamento, caracterização e quantificação de substâncias com potencial alelopático são fundamentais para determinação de sua atividade biológica individual ou em conjunto com outras substâncias (Trezzi *et al*, 2005), portanto se faz necessário o uso de técnicas cromatográficas para que se possa separar tais substâncias e identificá-las.

A cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Collins *et al.*, 1993).

Alves e colaboradores (2004) analisaram os possíveis efeitos alelopáticos de extratos voláteis de óleos essenciais através de técnicas cromatográficas, chegando à conclusão que o ácido cinâmico foi o composto responsável pela inibição tanto da germinação como do crescimento da raiz de *Lactuca sativa* , por ter sido o composto encontrado em maior quantidade no óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.).

Hernández-Terrones e colaboradores (2007) obtiveram um extrato metanólico do caule de *Pterodon emarginatus* Vog. (sucupira-branca), o qual foi fracionado por cromatografia com uso de diversos solventes ou mistura de solventes. As frações obtidas que apresentaram maior porcentagem de inibição sobre o desenvolvimento da raiz de *Panicum*

maximum Jacq. (capim-colonião) foram as frações extraídas com diclorometano (70%) e acetato de etila (77%).

1.6 Influências do solo na atividade alelopática

Segundo Inderjit (1996), a atividade alelopática na natureza envolve fatores bióticos, como densidade vegetal, estádios de crescimento das plantas e a presença de microrganismos, e também fatores abióticos, como solo, disponibilidade de água, temperatura e incidência de raios UV, dentre outros. Tais fatores podem afetar a liberação, disponibilidade, composição química e o modo de ação das substâncias alelopáticas.

Em situações de campo os aleloquímicos devem acumular e persistir nos níveis fitotóxicos e entrar em contato com a planta-alvo, assim sendo um mecanismo ecologicamente relevante influenciando o crescimento das plantas (Choesin & Boerner, 1991). O contato de produtos químicos pelas raízes da planta-alvo é mais importante do que a concentração e disponibilidade no solo (Blum *et al*., 1999), já que tais fatores tornam-se menos relevantes se a planta-alvo não estiver próxima aos aleloquímicos.

O tipo de aleloquímico, microflora e condições de cada substrato desempenham um papel importante na determinação da persistência dos aleloquímicos no solo. Após o isolamento e identificação dos aleloquímicos, torna-se necessário estudar o seu comportamento no solo (Inderjit, 2005).

Produtos químicos na solução do solo podem ser absorvidos pelas plantas, mas também estão sujeitos a processos de degradação, como fotólise, oxidação e degradação microbiana, e aos processos de remoção ou transferência, como volatilização e adsorção (Weber & Miller, 1989; Weber *et al*. 1986). A concentração dos aleloquímicos na água do solo é um fator dominante que determina diretamente a atividade fitotóxica, como acontece com herbicidas (Kobayashi, 2002).

Em muitas situações, um composto liberado pelas plantas pode ser inócuo, enquanto o produto da degradação microbiana pode ser tóxico (Inderjit & Dakshini, 1999). Microorganismos do solo podem metabolizar nutrientes lixiviados, produzindo produtos secundários que podem ter ações totalmente diferentes sobre as plantas do que a substância original (Tukey, 1969).

1.7 Alelopatia em plantas do Cerrado

Estudos conduzidos com espécies do Cerrado têm mostrado que extratos aquosos de diversas partes das plantas têm causado efeitos alelopáticos sobre as espécies alvo. Podem ser

citados diversos trabalhos na literatura em que foi avaliado o potencial alelopático de espécies do Cerrado.

Oliveira e colaboradores (2004 a, b) constataram que extratos aquosos de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* tiveram efeitos inibitórios na germinação e desenvolvimento inicial de *Sesamum indicum* em substrato papel de filtro. Foram constatados efeitos inibitórios de extratos aquosos de folhas e frutos de *S. lycocarpum* sobre a germinação e crescimento de *S. indicum* também em substrato solo (Aires *et al*., 2005).

Gatti e colaboradores (2004), constataram efeitos alelopáticos inibitórios de diversas partes de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze (jarrinha) sobre a germinação de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus.*

Estudos recentes mostraram que extratos foliares de *Caryocar brasiliense* (pequi), *Eugenia dysenterica* (cagaita) e *Qualea parviflora* (pau-terra) inibem o crescimento inicial das espécies invasoras *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Digitaria horizontalis* Willd. (capim colchão) e *Melinis minutiflora* Beauv. (capim gordura) (Aires, 2007).

Giotto e colaboradores (2007) constataram efeitos alelopáticos de extratos de *Eugenia dysenterica* também sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa*. Com a extração realizada com água fria, a concentração de 1% obteve maior índice de inibição da parte aérea, enquanto da parte radicular foi a 5%. Já com a extração com água quente, a concentração de 2% obteve maior índice de inibição da parte aérea, enquanto da parte radicular foi a 4% e 5%.

Usando-se triturado de folhas misturadas ao solo, Souza e colaboradores (2007) comprovaram efeito alelopático de *Campomanesia adamantinum* (guavira), *Caryocar brasiliense, Eugenia dysenterica e Qualea parviflora* sobre o crescimento das plântulas de *Sesamum indicum*. Na concentração de 1%, observou-se diferença significativa entre os comprimentos da parte aérea e radicular em relação ao controle para o triturado de *C. brasiliense* e *E.dysenterica*. Na concentração 3%, houve diferença significativa em todos os tratamentos.

Silva e colaboradores (2006) realizaram estudos com 15 espécies arbóreas do Cerrado, testando o efeito do pó e de extratos etanólicos de folhas sobre a germinação de alface. Os bioensaios foram realizados em diferentes substratos, placas de Petri com papel de filtro, terra estéril e não estéril. Das 15 espécies investigadas apenas quatro mostraram efeito inibidor de germinação: *Ouratea spectabilis* Mart., *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., *Qualea grandiflora* Mart. e *Stryphnodendron adstringens* Mart.

Recentemente foram realizados estudos para constatação de efeitos alelopáticos dos extratos obtidos das folhas secas e frescas de *Eugenia dysenterica* sobre o crescimento de

gergelim e rabanete. Os extratos causaram uma forte redução no crescimento das plântulas, sendo que o extrato obtido com as folhas secas se mostrou mais inibitório (Pina *et al*., 2009).

Segundo Oliveira e colaboradores (2004a), a identificação de propriedades alelopáticas em espécies nativas do Cerrado abre perspectivas de que tais efeitos possam se encontrar entre os fatores determinantes da dinâmica da vegetação das fitofisionomias de tal bioma, já que em ambientes naturais, a alelopatia desempenha um importante papel na dominância, sucessão e formação de comunidades vegetais (Chou, 1999).

1.8 Espécie em estudo

A espécie cujo efeito alelopático será testado pertence à família Caryocaraceae. Tal família é encontrada no neotrópico e têm dois gêneros, *Anthodiscus* G. F. W. Meyer e *Caryocar* L. (Kerr *et al*. 2007), e 26 espécies, onde 16 são do gênero *Caryocar* (Araújo, 1995). No Brasil ocorrem os dois gêneros e 13 espécies, sendo 10 de *Caryocar* e três de *Anthodiscus* (Souza & Lorenzi, 2005). As espécies dessa família são muito exploradas devido ao óleo encontrado no mesocarpo (Araújo, 1995).

O pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), também conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, ocorre em todo o Cerrado brasileiro, que inclui os estados do Pará, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Paraná, como também nos estados nordestinos, Piauí, Ceará e Maranhão (Lima *et al*., 2007). O uso dos frutos de pequi na culinária é bem conhecido em comunidades tradicionais (especialmente em Goiás e Minas Gerais) e indígenas que ainda hoje usam os frutos também como isca de caça e para pintura corporal (Ribeiro, 2000).

C. brasiliense possui folhas compostas trifolioladas e frutos do tipo drupa (Souza & Lorenzi, 2005). A folhação ocorre de julho a setembro (Silva Júnior, 2005), a floração ocorre durante os meses de setembro a novembro e os frutos iniciam a maturação em meados de novembro, prolongando-se até o início de fevereiro (Lorenzi, 2000). *C. brasiliense* perde parcialmente as folhas no início da estação seca e totalmente por um breve período no final da mesma estação, sendo portanto uma espécie brevidecídua (Ribeiro, 2000).

Segundo Almeida e colaboradores (1998), o pequizeiro é uma planta que se desenvolve em ambientes ensolarados e apresenta adaptações à seca, ocorrendo sempre em agrupamentos mais ou menos densos, havendo 15 a 180 indivíduos/hectare em áreas de cerrado *strictu sensu* do DF.

O pequizeiro também é considerado árvore ornamental devido ao seu porte e à beleza das flores, que atraem beija-flores e diversas espécies de abelhas durante o dia, todavia, seus principais polinizadores são os morcegos e mariposas noturnas (Kerr *et al*., 2007).

Existem relatos de atividade medicinal para *C. brasiliense.* Em estudos fitoquímicos realizados com o pequi, o extrato alcoólico das folhas apresentou atividade antitumoral contra sarcoma 180 (Oliveira *et al*., 1970) e os óleos essenciais das sementes possuem atividade antifúngica, sendo que o principal composto envolvido é o hexanoato de etila (Passos *et al*., 2003). Bezerra e colaboradores (2002) demonstraram que extratos brutos etanólicos preparados das cascas e das folhas do *C. brasiliense* possuem atividade tóxica contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente causador da esquistossomose.

Objetivos Gerais

Os objetivos deste trabalho foram realizar fracionamento e isolamento de compostos ativos (fitotóxicos) presentes nas folhas de C*aryocar brasiliense* e determinar os efeitos alelopáticos do triturado de folhas incorporado ao solo sobre o crescimento inicial de espécies alvo.

Objetivos Específicos

a) Fracionar extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) buscando purificar compostos responsáveis pela atividade inibitória.

b) Determinar efeitos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) adicionado ao solo sobre o crescimento das espécies alvo *Sorghum bicolor* (L.) Moench (cultivada monocotiledônea), *Sesamum indicum* L. (cultivada eudicotiledônea), *Brachiaria decumbens* Stapf. (invasora) e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.(nativa).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAVOLI, M. R.; DE SANTIS, C.; SIDARI, M.; SORGONÀ, A.; BADIANI, M., CACCO, G. 2001. Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat. *New Phytologist* 150: 619–627.

AIRES, S.S. 2007. Potencial alelopático de espécies nativas do Cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras. Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília. 61p.

AIRES, S.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F**.** 2005**.** Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. *Acta Botanica Brasilica* 19(2): 339-344.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M. & RIBEIRO, F.J. 1998. *Cerrado-Espécies vegetais úteis*. Planaltina DF, EMBRAPA.

ALMEIDA, F.S. 1988. *A alelopatia e as plantas*. Londrina. IAPAR. Circular,53. 60p.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesquisa Agropecuária Bras*ileira v.39 n.11: 1083-1086.

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. 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.

AN, M., LIU, D., JOHNSON, I., & LOVETT, J. 2003. Mathematical modelling of allelopathy: II. The dynamics of allelochemicals from living plants in the environment. *Ecological Models,* 161:53-66.

ARAÚJO, F.D. 1995. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an economically valuable species of the Central brazilian Cerrados. *Economic Botany* 49: 40-48.

BATISH, D. R.; LAVANYA, K.; SINGH, H.P., KOHLI, R. K. 2007. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. Plant Growth Regul 51:119–128

BATISH, D.R.; SETIA, N.; SINGH, H.P., KOHLI, R.K. 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Protection* 23 (2004) 1209–1214.

BEZERRA J.C.B.; SILVA I.A.; FERREIRA H.D.; FERRI P.H. E SANTOS S.C. 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalatia glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia* 73: 428-430.

BLUM, U.; SHAFER, S.R., LEHMAN, M.E. 1999. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. experimental model. *Critical Review in Plant Sciences*, 18: 673–693.

CHOESIN, D.N & BOERNER R.E.J. 1991. Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 78: 1083–1090.

CHOU, C. H. 1999. Role of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Review in Plant Sciences, 18:* 609-636.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. 1993. *Introdução a métodos cromatográficos***.** 5ª ed. Editora da Unicamp.

DUKE, S.O.; SCHEFFLER, B.E.; DAYAN, F.E. 2001. Allelochemicals as herbicides. *First European Allelopathy Symposium*: 47-59.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; DAYAN, F.E.; CANEL, C.; WEDGE, D.E.; TELLEZ, M.R.; SCHRADER, K.K.; WESTON, L.A.; SMILLIE, T.J.; PAUL, R.N.; DUKE, M.V. 2000. Strategies for the discovery of bioactive phytochemicals. *In*: BIDLACK, W.R.; OMAYE, S.T.; MESKIN, M.S.; TOPHAM, D.K.W. *Phytochemicals as bioactive agents* Technomic Publishing :1-20.

DUKE, S.O; DAYAN F.E; HERNANDEZ, A., DUKE, M.V, ABBAS, H. K. 1997. Natural products as leads for new herbicide modes of action. *In*: Proceedings Brighton Crop Protection Conference-Weeds 579–586.

EINHELLIG, F.A. & LEATHER, G.R. 1988. Potentials for explointing allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology,*14 (10): 1829-1844.

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

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. 2004.Atividade alelopática dos extratos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L**.** *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 459-472.

GIOTTO, A.N.; 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.

HEJL, A.M. &. KOSTER, K. L. 2004. Juglone disrupts root plasma membrane HC-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology,* 30(2): 453-471.

HERNÁNDEZ-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.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; STEIN, V.C., ROCHA, B.H.G. 2006. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de Allium cepa L. *Arquivos do Instituto Biológico,* 73 (1): 79-82.

INDERJIT. 2005. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil*, 274:227–236.

INDERJIT & NILSEN, E.T. 2003. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: Progress and problems. *Critical Reviews in Plant Sciences,* 22 (3-4) 221-238.

INDERJIT & WESTON, L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal of Chemical Ecology,*26 (9): 2111-2118.

INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M. 1999. Allelopathic potential of well water from Pluchea lanceolata-infested cultivated fields. Journal oh Chemical Ecology, 22: 1123–1131.

INDERJIT. 1996. Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review,* 62:186-202.

INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review,* 61: 28-44.

International Allelopathy Society (IAS) Constitution and bylaws. 1996. http//www.ias.uca.es/bylaws.htm.

IQBAL, Z.; HIRADATE, S.; NODA, A.; ISOJIMA, S., FUJII, Y. 2003. Allelopathic Activity of Buckwheat: Isolation and Characterization of Phenolics. *Weed Science,* 51(5) 657-662.

KERR, W.E.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, B. 2007. Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Revista Brasileira de Fruticultura,* 29(1): 169-171.

KOBAYASHI K. 2002. Behaviors and phytotoxic activities of herbicides in soil. J*ournal of Weed Science. Technology,* 47: 89-96.

KONG, C.H.; WANG, P.; ZHAO, H.; XU, X.H., ZHU, Y.D. 2008. Impact of allelochemical exuded from allelopathic rice on soil microbial community. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1862–1869.

LEATHER, G.R. & EINHELLIG, F.A. 1986. Bioassays in the study of allelopathy. *In:* PUTNAN, A.R. & TANG, C.S. *The Science of Allelopathy.* John Wiley and sons, New York, NY. 133-145.

LIMA, A.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. 2007. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(3): 695-698.

LORENZI, H. 2000. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4ª ed. vol.1 Instituto Plantarum. 368 p.

MACÍAS, F.A.; MARÍN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; VARELA, R.M.; SIMONET, A.M.; CARRERA, C.; MOLINILLO, J.M.G. 2003. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space*, 17(1):18-23.

MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. 2000.Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. *Journal of Agricultural Food Chemistry***,** *4:* 2512-2521.

MILLER, D.A. 1996. Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal*, 88 (6): 854-859.

NIMBAL, C.I., YERKES, C.N., WESTON, L.A. & WELLER, S. C. 1996. Herbicidal activityand site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54: 73-83.

OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. 2004 a. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* St.Hill (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botanica Brasilica*,18(3): 401-406.

OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. 2004 b. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. *Allelopathy Journal,* 13(2): 201-210.

OLIVEIRA, M.M; SAMPAIO, R.P; GIORGI, W.; GILBERTI, B., MORS, W.B. 1970. *Caryocar brasiliense*-isolamento e identificação de algumas substâncias com atividade biológica sobre o sarcoma 180. *Arquivos do Instituto de Biologia,* 37:25-27.

PASSOS, X. S.; CASTRO, A.C.M.; GARCIA, A.C.F.; CAMPOS, F.C.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H., SILVA, M.R. 2003. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliense*. *Pharmaceutical Biology,* 41(5) 319-324.

PEDROL, N., GONZÁLES, L. & REIGOSA, M. 2006. Allelopathy and abiotic stress. *In*: M. REIGOSA, N. PEDROL, & L. GONZÁLES. *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* . Netherlands: Springer. 171-209.

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): 313-322.

PINA, G.O. 2008. Efeito alelopático do extrato aquoso foliar de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae-cagaita) na germinação , crescimento e morfo-anatomia de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae-gergelim) e *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae-rabanete). Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília. 105p.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. 1999. Ecophysiological Approach in Allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences,* 18(5): 577 - 608.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. 2002. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens**.** *Boletim Agropecuário* nº 54. Lavras-MG. 55p.

RIBEIRO, R.F. 2000. Pequi, o rei do cerrado: roendo o fruto sertanejo de todos os lados. Rede Cerrado/Campo Vale. 62 p.

RICE, E.L. 1984. *Allelopathy*. Academic Press. New York. 423 p.

RICE, E.L. 1979. Allelopathy-an update. *The Botanical Review*, 45:15-109.

ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O., DAYAN, F.E. 2000. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiology*, 123: 725-732.

SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; COBA DE LA PEÑA, T., REIGOSA, M.J. 2008. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry*, 69: 2172–2179.

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

SOUZA, L.M.; CANINI, G.B.; AIRES, S.S.; BORGHETTI, F. 2007. Efeito alelopático de folhas de quatro espécies do Cerrado sobre crescimento de gergelim. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 540-542.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. *Botânica Sistemática*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 640 p.

SOUZA FILHO, A.P.S. 2002a. Alelopatia: das primeiras observações aos atuais conceitos. *In:* SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 16-23.

SOUZA FILHO, A.P.S. 2002b. Alelopatia em agroecossistemas. *In:* SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M (eds). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 155-204.

SOUZA FILHO, A.P.S & ALVES, S.M. 2002. 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.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3ª.ed. Porto Alegre, Editora Artmed.

TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A.; PERALBA, M.C.R.; DICK, D.P.; KRUSE, N.D. 2005. Purificação e identificação de sorgoleone e sua quantificação em genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente,* 15:105-112.

TUKEY, H.B. 1969. Implications of Allelopathy in agricultural plant science . *Botanical Review*, 35(1)1-16.

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

WEBER, J.B. & MILLER, C.T. 1989. Organic chemical movement over and through soil. *In*: SAWHNEY, B.L., BROWN, K.W. (eds.). Reactions and movement of organic chemicals in soils (SSSA Special Publication n. 22). Madison: Soil Science Society of America, 305-334.

WEBER, J.B.; SWAIN, L.R., STREK, H.J. 1986. Soil, herbicide sorption and model plant-soil systems. *In*: CAMPER, N.D. (ed.). Research methods in weed science. Champaign: SWSS, 155-188.

WESTON, L.A. & DUKE, S.O. 2003. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences,* 22(3 & 4):367-389.

WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. 2000. Distribuition and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology* 26(9): 2141-2154.

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.

Capítulo 1

Fracionamento e identificação das frações ativas a partir de extratos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)

Fracionamento e identificação das frações ativas a partir de extratos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)

RESUMO

Nos estudos de alelopatia, para conhecer a composição dos extratos e associar os seus efeitos nos organismos, é importante isolar a(s) substância(s) ativa(s). O objetivo desse trabalho foi extrair com diferentes solventes compostos alelopáticos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) e fracionar o extrato mais ativo buscando a purificação de compostos ativos. Como bioensaio, utilizou-se o crescimento do gergelim. Folhas maduras foram coletadas, secas por 24h a 50ºC e trituradas. Esse triturado foi extraído com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e água, na proporção 1:5 (p/v). Os extratos foram filtrados em papel de filtro, secos em rotavapor e ressuspensos em água nas concentrações 800, 400 e 200 ppm. Como controle negativo utilizou-se herbicida Glifosato, e como controle positivo água destilada. Foram utilizadas 4 replicatas com 20 sementes de gergelim por placa de Petri, por tratamento. As sementes foram mantidas por 7 dias à 30ºC e fotoperíodo de 12 h. Ao fim do experimento as plântulas tiveram o comprimento de suas partes aéreas (PA) e radiculares (PR) medidas com paquímetro digital. O extrato mais ativo foi fracionado em cromatografia líquida em coluna com ordem crescente de polaridade com eluente hexano:acetato de etila, acetona e metanol. Foram obtidas 9 frações (F1 a F9) identificadas por cromatografia em camada delgada (CCD), as quais tiveram suas atividades testadas. As condições experimentais as mesmas descritas acima, entretanto o número de sementes de gergelim foi 10 por placa, e a duração de 5 dias. O extrato considerado mais ativo foi o de acetato de etila a 800 ppm na PA e a 400 ppm na PR. Este extrato apresentou similaridade em CCD com outros extratos, também ativos. Após fracionamento do extrato acetato de etila, duas frações se mostraram as mais ativas: F2 (50% hexano: acetato) e F8 (100% acetona). As frações F2, F5, F6 e F7 foram utilizadas para purificação de compostos, visto que seus efeitos no crescimento inicial foram equivalentes ao herbicida Glifosato. Esta análise está em andamento. Conclui-se que folhas de *C. brasiliense* são potencialmente produtoras de compostos bioativos, e que extração com acetato de etila rende os produtos mais ativos.

Palavras-chave: Extratos orgânicos, *Caryocar brasiliense*, cromatografia.

Fractionation and identification of active fractions from leaf extracts of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)

ABSTRACT

In allelopathic studies, a better understanding of the effects of plant extracts on target organisms requires the identification of the active compounds involved. The aim of this study was to conduct a serial extraction of leaves of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) with solvents of increasing polarities and fractionate the most actives in order to identify active compounds. For bioassays, sesame was the target species. Mature leaves were collected, dried at 50° C for 24h and ground. This ground was extracted with organic solvents in order of increasing polarity: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol and water, in the ratio 1:5 (w/v). The extracts were filtered on filter paper, evaporated and resuspended in water at concentrations of 800, 400, and 200 ppm. The herbicide glyphosate was used as the negative and distilled water as the positive control. Four replicates of 20 seeds were used per treatment. The experiment was conducted for seven days at 30º C and a photoperiod of 12 h. At the end of the experiment the seedlings had the length of their shoot parts (SP) and root parts (RP) measured with digital caliper. The most active extract was ethyl acetate at 800 ppm (for SP) and 400 ppm (for RP). This extract showed similarity in TLC with other active extracts. So, the ethyl acetate extract was fractionated through liquid chromatography column with the eluents hexane:ethyl acetate, acetone and methanol in order of increasing polarity. Nine fractions (F1-F9) were identified by thin-layer chromatography (TLC), and they had their activities on sesame growth tested. The experimental conditions were the same as described above, except the number of sesame seeds was 10 per plate and the experiment last for 5 days. From these, five fractions were found to be active F2, F5, F6, F7 and F8. Their effects on the initial growth of sesame were equivalent to the herbicide glyphosate. The fractions F2 (50% hexane: acetate) and F8 (100% acetone) were the most active. The search and identification of the active compounds present in these fractions are in progress. We conclude that leaves of *C. brasiliense* are capable of producing bioactive compounds, and extraction with ethyl acetate yields the most active products.

Keywords: Organic extracts, *Caryocar brasiliense* chromatography.

INTRODUÇÃO

Uma das técnicas mais utilizadas nos estudos de alelopatia envolve o preparo de extratos aquosos a partir de tecidos de plantas, observando a influência desses extratos na germinação e no crescimento das plântulas (Putnam, 1985; Inderjit & Dakshini, 1990), metodologia essa encontrada em diversos trabalhos na literatura (Hernández-Terrones *et al*. 2007; Centenaro *et al*., 2009; Peres *et al*., 2009). A sensibilidade das plantas aos compostos varia de acordo com a concentração aplicada e composição química do extrato (Perez, 1990, Rimando *et al*., 2001).

Nos estudos de alelopatia, para conhecer a composição dos extratos e associar os efeitos, é necessário isolar e identificar a(s) substância(s) que acarreta(m) tais efeitos (Inderjit & Del Moral, 1997). Durante esse processo, é necessário realizar bioensaios em cada passo do isolamento, purificação e processos de identificação de compostos ativos (Stowe & Kil, 1981).

Duke e colaboradores (2000) descrevem metodologia de extração de aleloquímicos dos órgãos das plantas com água ou solventes orgânicos, para uso em bioensaios. Os mais ativos são selecionados e fracionados utilizando técnicas de cromatografia. As frações são testadas, e as mais fitotóxicas são selecionadas para continuar fracionamento. Esta seqüência é repetida até os produtos puros serem encontrados. Estes produtos são estruturalmente caracterizados e realizados bioensaios novamente para determinar seus efeitos fitotóxicos. Esta metodologia é freqüentemente utilizada não só para estudos alelopáticos, mas na busca de produtos farmacêuticos e outras substâncias bioativas, que resultam na maioria dos aleloquímicos conhecidos, sendo tal processo conhecido como isolamento biodirigido.

Estudos com o uso de HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) permitem o isolamento e purificação de compostos em pequenas quantidades presentes nas plantas, e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em combinação com outras técnicas tais como espectrometria de massa e espectrofotometria de infravermelhos, tem permitido a identificação de quase todos os aleloquímicos conhecidos até hoje (Macías *et al*., 2008).

A família Caryocaraceae possui dois gêneros, *Anthodiscus* G. F. W. Meyer e *Caryocar* L. (Kerr *et al*., 2007), e 26 espécies, onde 16 são do gênero *Caryocar* (Araújo, 1995). As espécies dessa família são muito exploradas devido ao óleo encontrado na polpa do mesocarpo (Araújo, 1995). *Caryocar brasiliense* Camb. é uma espécie comumente encontrada no Cerrado que possui amplo uso na alimentação de comunidades tradicionais e indígenas (Ribeiro, 2000), além de possuir uso medicinal (Oliveira *et al*., 1970; Bezerra *et al*., 2002; Passos *et al*., 2003).

O objetivo deste trabalho foi fracionar extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) que apresentam comprovado potencial alelopático, buscando purificar compostos responsáveis pela atividade inibitória através de isolamento biodirigido.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das folhas de *Caryocar brasiliense*

Folhas maduras de indivíduos adultos de *Caryocar brasiliense* foram coletadas no campus da Universidade de Brasília no mês de fevereiro de 2009, e secas em estufa a 50°C durante 24 horas. As folhas secas foram então levemente trituradas em liquidificador com pulsos curtos e intermitentes.

Extração

Para a extração foram utilizados potes de vidro com tampa onde foram colocadas 100g de folhas trituradas e acrescentados 500 ml de hexano, sendo que o vidro permaneceu em banho de ultrassom por 1 hora para que houvesse a extração dos compostos com afinidade pelo solvente. A amostra obtida após 1 hora foi filtrada a vácuo e seca em rotavapor. A extração seguiu de maneira seqüencial nas mesmas condições com os demais solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol.

Foi realizada extração com água destilada como solvente nas mesmas condições já descritas, porém tal extração foi realizada com outros 100g de triturado de folhas (não ocorreu de maneira seqüencial com os solventes orgânicos), para com isso simular a ação da água da chuva e extrair compostos que possam estar presentes na natureza.

Bioensaios

Bioensaios monitorados tendo o gergelim (*Sesamum indicum* L.- Pedaliaceae) como espécie-alvo foram conduzidos com todos os extratos obtidos do triturado da folha de pequi para quantificar sua atividade.

As soluções obtidas nas extrações após serem secas em rotavapor foram ressuspensas em água destilada nas concentrações 200, 400 e 800 ppm, sendo acrescentado DMSO (dimetil sulfóxido) na proporção de 5µl/ml para facilitar a solubilidade em água destilada. Como controle negativo utilizou-se o herbicida Glifosato nas mesmas concentrações dos extratos e como controle positivo água destilada. O DMSO foi adicionado em todas as soluções, inclusive nos controles.

O bioensaio foi realizado em placa de Petri (9 cm de diâmetro) sobre papel de filtro como substrato onde foi adicionado 20 sementes não germinadas de gergelim por placa. Foram realizadas 4 replicatas por tratamento. O volume de extrato por placa de Petri foi de 3 ml, volume definido com a ajuda de teste piloto realizado previamente. O extrato foi colocado

uma única vez em cada placa. Após a colocação das sementes e dos extratos, as placas foram fechadas com Parafilm® e colocadas em câmara de germinação por 7 dias à 30 ºC e fotoperíodo de 12 horas.

Ao final dos 7 dias as placas foram mantidas à -10 ºC para assim deter o crescimento das plântulas e permitir que as medições fossem realizadas em dias distintos. As plântulas tiveram o comprimento de suas partes aéreas (PA) e radiculares (PR) medidas com paquímetro digital.

O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle segundo a fórmula:

% inibição = (XT * 100/ XC) -100

Onde XT é a média de crescimento dos tratamentos e XC a média de crescimento do controle. Os resultados são expressos em diagramas de barras nos quais os valores negativos representam inibição e valores positivos estimulação nos parâmetros avaliados.

Fracionamento do extrato mais ativo

O extrato considerado mais ativo foi fracionado em coluna cromatográfica, de sílica gel Merck (0,06 – 0,2mm) como fase estacionária, em pressão atmosférica (a coluna tinha 50 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro, com uma altura de sílica de aproximadamente 30 cm). O material a ser fracionado foi aplicado na parte superior da coluna e coberto com um pouco de sílica. Como fase móvel utilizou-se eluente hexano: acetato de etila em diferentes proporções de 0 a 100%, seguidos de 100% acetona e 100% metanol. Desse fracionamento, foram recolhidos 82 alíquotas e estas foram unidas conforme similaridade em CCD (Cromatografia de camada delgada) originando 9 frações.

As placas de CCD utilizadas eram da marca Machery-Nagel de alumínio e sílica e o tamanho usado foi 4x5 cm. Para a revelação dos resultados as placas foram imersas em Oleum (uma mistura de ácido sulfúrico, água e ácido acético, nas proporções 1:4:20, respectivamente) e posteriormente aquecidas (“queimadas”) a 150 ºC.

O bioensaio para testar a atividade das nove frações foi montado conforme o bioensaio descrito anteriormente, entretanto foram utilizadas placas de Petri com 4 cm de diâmetro onde foram adicionadas 10 sementes não germinadas de gergelim e 1 ml de extrato por placa, permanecendo em câmara de germinação por 5 dias.

Purificação e identificação dos compostos ativos

As frações em que foi constatada maior atividade e possuíam quantidade suficiente foram purificadas através de coluna cromatográfica em pressão atmosférica, para que os compostos isolados e purificados fossem assim identificados através de ressonância magnética nuclear (RMN^{1}H) e comparados com a literatura. A coluna foi montada com sílica gel Merck 0,06 – 0,2 mm como fase estacionária (a coluna tinha 57 cm de altura e 2 cm de diâmetro, e a coluna interna de sílica ficou numa altura de aproximadamente 35 cm) e como fase móvel utilizou-se eluente hexano: acetato de etila em diferentes proporções em polaridades crescentes a partir de 30% a 100%, acetato de etila: acetona (50:50), 100% acetona e 100% metanol. Através de análises em CCD foi possível definir a seqüência dos solventes ou mistura de solventes (fase móvel) a serem usados.

Frações que se encontravam contaminadas com clorofila foram submetidas a carvão ativo e centrifugadas por aproximadamente 1 minuto a 3000 rpm para que houvesse a remoção da clorofila das amostras, não havendo perda de produto comparado em CCD.

Análise estatística

As análises estatísticas das médias obtidas foram baseadas em testes paramétricos e não-paramétricos, dependendo dos resultados obtidos. Para dados paramétricos foi utilizada a análise da variância (ANOVA) comparando-se as médias usando o teste de Tukey a 5%. Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis comparando-se as médias usando o teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado para as análises foi o BioEstat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração dos compostos

O rendimento (massa) aproximado obtido com cada solvente durante o processo de extração com os 100g do triturado de folhas de pequi pode ser visualizada na Figura 1.

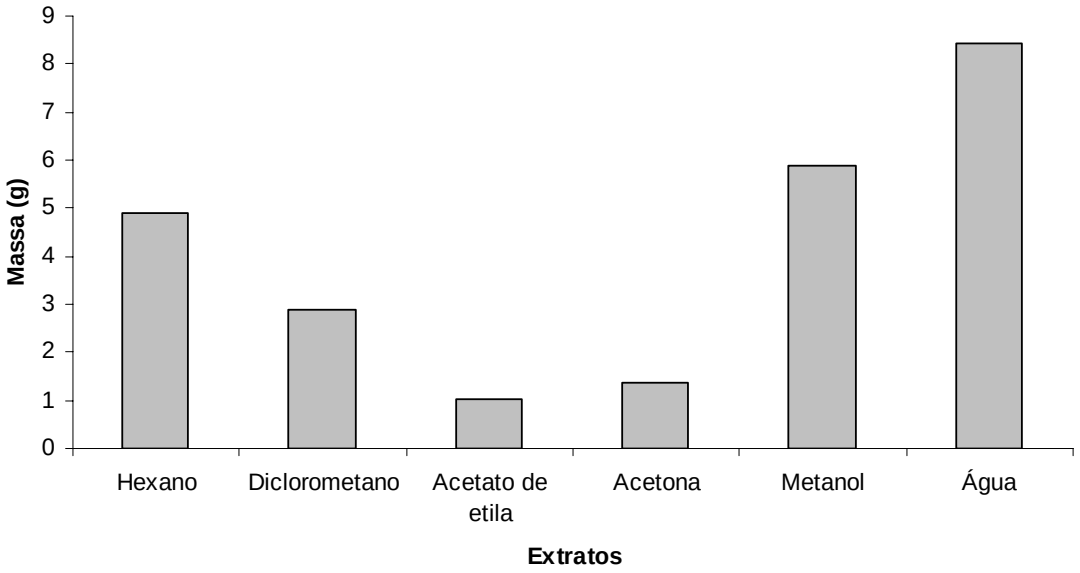


Figura 1. Massa (g) obtida com diferentes solventes a partir de 100 gramas de folhas trituradas de *Caryocar brasiliense* Camb.

Os extratos obtidos com solventes de menor polaridade, hexano e diclorometano, e os de maior polaridade, metanol e água, foram os que obtiveram maior rendimento. Já os extratos obtidos com solventes de polaridade intermediária, acetato de etila e acetona, obtiveram um rendimento mais baixo.

Segundo Cechinel Filho (1998) o metanol possibilita a extração de um maior número de compostos em comparação aos outros solventes. Cipollini e colaboradores (2008) afirmam ainda que na extração de metabólitos secundários de plantas, o metanol é comumente utilizado com sucesso para extrair uma vasta gama de metabólitos polares, muitos dos quais também devem estar presentes em extrato aquoso. Tais fatores e o fato de grande parte dos açúcares presentes nas folhas possuírem maior afinidade por esses dois solventes, como já observado em outros estudos (Lima *et al*., 2009, Moreira *et al*., 2003) podem justificar o alto rendimento dos extratos aquoso e metanólico.

A presença de cera nas folhas pode indicar uma adaptação às condições de cerrado, onde predominam altas intensidades luminosas e as espécies lenhosas apresentam elevadas taxas de transpiração (Salatino *et al*., 1986). No extrato hexânico e de diclorometano

provavelmente foram extraídas as ceras e gorduras presentes nas folhas, já que tais solventes possuem afinidade por tais compostos (Ayres *et al*., 2008, Cechinel Filho, 1998).

Por análise em cromatografia de camada delgada (CCD) verificou-se que o extrato de acetato de etila apresentava substâncias também presentes nos extratos de hexano, diclorometano e acetona, porém o último extrato possuía menos produtos. Não se encontrou produtos em quantidades majoritárias (mais evidentes) no extrato metanólico.

Bioensaio com os extratos

Os resultados dos efeitos fitotóxicos dos extratos de folhas de pequi sobre o crescimento do gergelim podem ser visualizados nas Figura 2 (parte aérea) e Figura 3 (parte radicular).

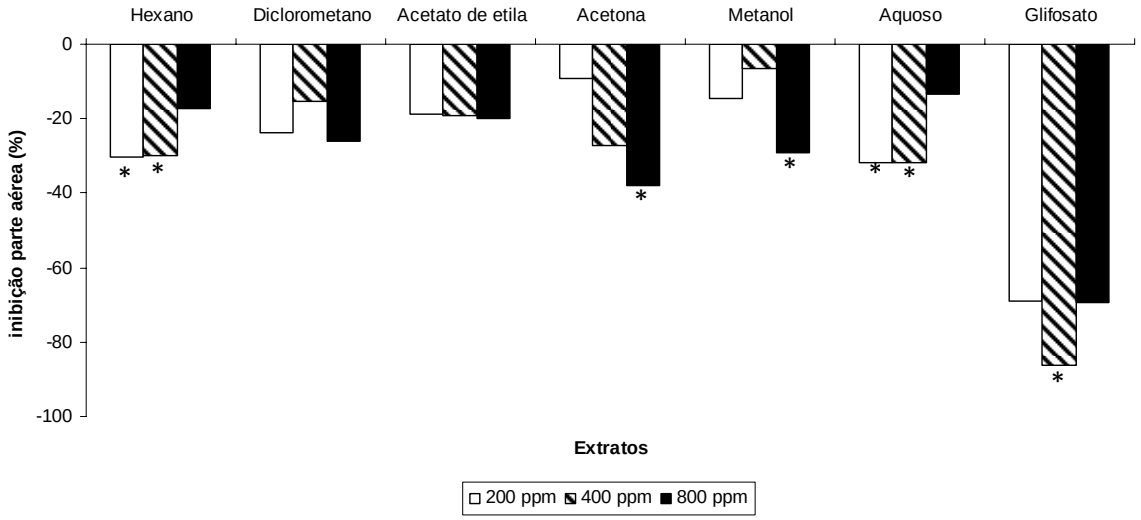


Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de S*esamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência dos extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* e do herbicida comercial Glifosato. * Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle com água destilada. $p < 0,05$.

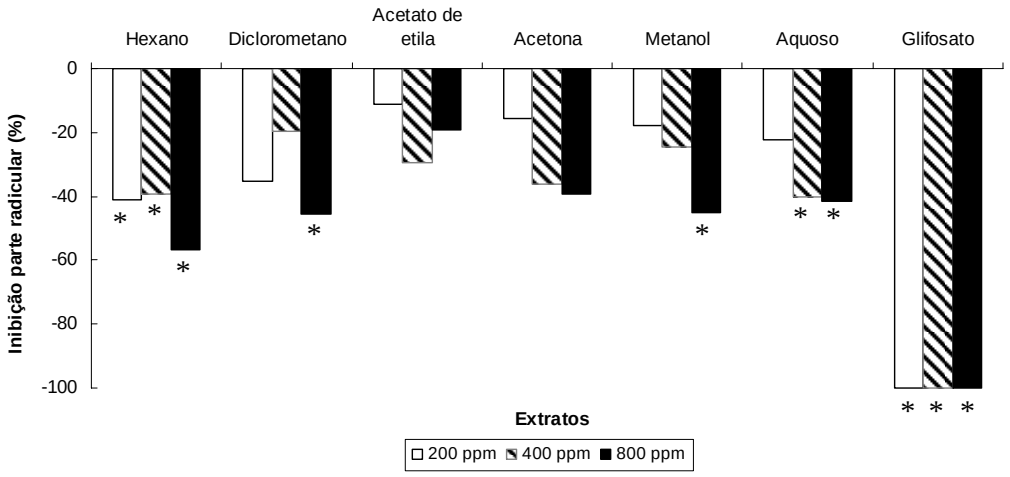


Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de S*esamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência dos extratos obtidos das folhas de *Caryocar brasiliense* e do herbicida comercial Glifosato. * Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle com água destilada. p< 0,05.

O extrato que apresentou maior efeito inibitório no crescimento da parte aérea das plântulas de gergelim foi o de acetona a 800 ppm (38%), seguido do extrato aquoso à 200 e 400 ppm (31%) e hexano à 200 ppm (30%) (Figura 2). Tanto no extrato aquoso quanto no hexânico as menores concentrações obtiveram maior efeito inibitório. Nos extratos de diclorometano e metanol a menor concentração foi mais inibitória do que a concentração intermediária.

A parte radicular se mostrou mais sensível aos aleloquímicos do que a parte aérea. Correia *et al.* (2005) sugere que a inibição da radícula por substâncias alelopáticas em experimentos com placa de Petri é sempre maior que a inibição da parte aérea, uma vez que os aleloquímicos são concentrados e absorvidos pelo tecido radicular favorecidos pelo contato físico com o papel filtro. Os extratos com maior atividade foram hexano (56%), diclorometano (45%) e metanol (45%), todos a 800 ppm. O extrato de diclorometano e muito discretamente o extrato hexânico obtiveram na concentração de 200 ppm maior índice de inibição do que à 400 ppm. Já no extrato de acetato de etila a concentração de 400 ppm foi a mais inibitória (Figura 3).

Nos estudos alelopáticos geralmente a bioatividade tende a exibir um padrão dose resposta, ou seja, a inibição observada é dependente da concentração de aleloquímicos disponíveis, com isso os compostos tendem a agir como inibidores em concentrações mais elevadas e essa atividade tende a diminuir com a diluição (Macías *et al.*, 2000)**,** o que é observado em diversos trabalhos (Chon & Kin, 2004, Chon *et al.*, 2002). Contudo, Reigosa e colaboradores (1999) afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar deste padrão, já que os efeitos observados resultam do somatório de uma série de alterações moleculares. Esse padrão

dose resposta não foi bem observado nos resultados, o que pode ter sido causado por um problema de solubilidade dos extratos em água (mesmo com o uso de DMSO), podendo vir a causar uma concentração diferente da esperada. O fato de ter sido usado somente três concentrações, limitando um estudo mais abrangente de efeito dose-resposta, também pode ser uma das causas para tal efeito.

Nenhum extrato conseguiu atingir o nível de inibição do herbicida comercial glifosato, que chegou a inibir 85% na parte aérea e 100% na parte radicular, o que pode ter sido ocasionado por não possuírem aleloquímicos disponíveis em quantidades suficientes para atingir tais índices e até mesmo pela mistura de compostos presentes.

Fracionamento do extrato mais ativo

Comparando os extratos em CCD observou-se que o extrato de acetato de etila, o hexânico, de diclorometano e acetona possuíam produtos majoritários similares. Nos extratos hexânico e de diclorometano havia impurezas como ceras e clorofilas, o que dificultaria o fracionamento desses já que se torna mais complexo a obtenção de produtos puros, enquanto no extrato de acetona havia a presença de menos produtos. Já os extratos metanólico e aquoso apesar de terem tido alto índice de inibição teriam que ser fracionados através de cromatografia reversa, procedimento utilizado nesses solventes. Com base nisso e no fato de a atividade do extrato de acetato de etila ter se apresentado de maneira estável em todas as concentrações, optou-se pelo fracionamento deste, mesmo não diferindo estatisticamente do controle.

Em outros estudos alelopáticos o extrato obtido com o solvente acetato de etila foi considerado mais ativo e por isso também escolhido para passar por fracionamento em coluna cromatográfica, como ocorreu com *Tachigali myrmecophyla* (Souza Filho *et al*., 2005a) e *Myrcia guianensis* (Souza Filho *et al*., 2006).

A coluna foi montada com 3 g de amostra (que foi seca no rotavapor juntamente com sílica) que ao ser colocada na coluna recebeu um pouco de sílica por cima. Foram coletadas 82 alíquotas durante o fracionamento, com volume médio de 40 mL cada. O volume dos eluentes usados no fracionamento pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1. Volume dos eluentes utilizados no fracionamento do extrato de folhas de *Caryocar brasiliense* obtido com solubilização em acetato de etila.

Alíquotas	**Eluente***	**Volume do eluente**
_____	5% Hx:AcOEt	400 ml
1	10% Hx:AcOEt	100 ml
2 a 6	15% Hx:AcOEt	200 ml
7 a 17	20% Hx:AcOEt	200 ml
18 a 22	30% Hx:AcOEt	200 ml
23 a 32	40% Hx:AcOEt	200 ml
33 a 43	50% Hx:AcOEt	200 ml
44 a 56	60% Hx:AcOEt	400 ml
57 a 65	70% Hx:AcOEt	400 ml
66 a 74	80% Hx:AcOEt	400 ml
75 a 78	100% AcOEt	400 ml
79 e 80	100% Acetona	200 ml
81 e 82	100% MeOH	200 ml

* o eluente é a mescla de solvente em que a alíquota foi coletada durante o fracionamento em coluna cromatográfica. Hx: hexano; AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol.

Após análise via CCD, as alíquotas foram reunidas em 9 frações (F1-F9), de acordo com sua similaridade cromatográfica, e seu rendimento e polaridade em que foram extraídos encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento (massa) das frações obtidas através do fracionamento do extrato acetato de etila proveniente das folhas de *Caryocar brasiliense.*

Fração	Massa (mg)	Eluente *
1	29,1	20% Hx:AcOEt
2	23,3	50% Hx:AcOEt
3	21,9	60% Hx:AcOEt
4	11,8	70% Hx:AcOEt
5	8,7	70-80% Hx:AcOEt
6	15,5	80-100% Hx:AcOEt
7	16,4	100% AcOEt
8	15,3	100% Acetona
9	141,7	100% MeOH

* o eluente é a mescla de solvente em que a fração foi coletada durante o fracionamento em coluna cromatográfica. Hx: hexano; AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol.

Bioensaio com as frações

Os resultados dos efeitos fitotóxicos das frações obtidas após fracionamento do extrato acetato de etila testadas sobre o crescimento do gergelim podem ser analisados na Figura 4 para parte aérea e Figura 5 para parte radicular.

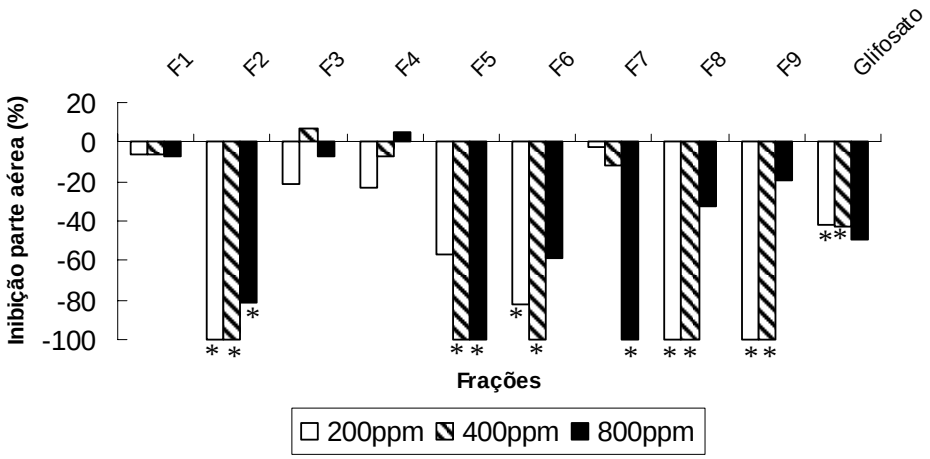


Figura 4. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Caryocar brasiliense*, e herbicida comercial Glifosato: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9).* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle com água destilada. $p < 0,05$.

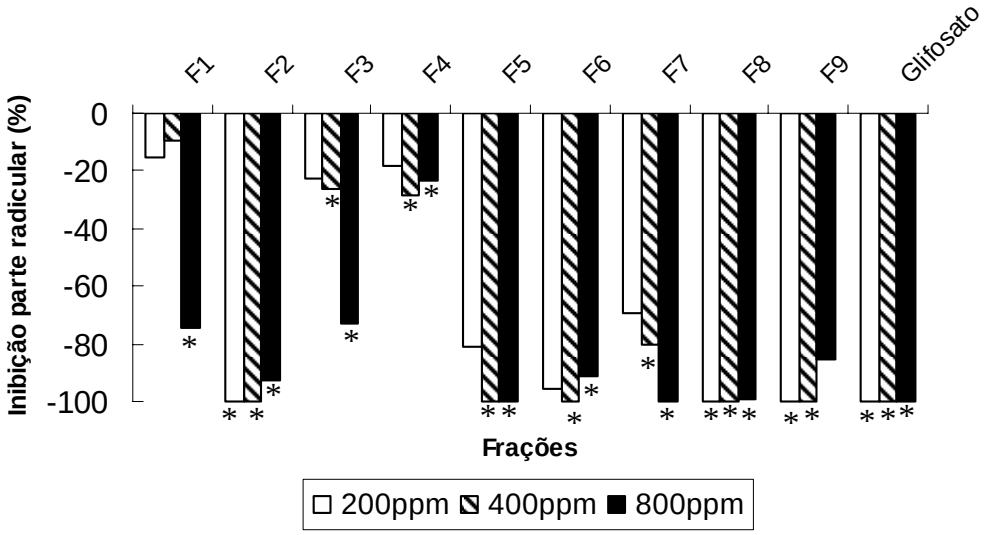


Figura 5. Porcentagem de inibição do crescimento da parte radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante cinco dias sob influência das frações do extrato de acetato de etila, obtido das folhas de *Caryocar brasiliense*, e herbicida comercial Glifosato: fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3), fração 4 (F4), fração 5 (F5), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 8 (F8), fração 9(F9).* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle com água destilada. $p < 0,05$.

Com relação à parte aérea, as frações menos ativas foram F1, F3 e F4, com o índice de inibição variando de 6% (F1 à 200 ppm) a 21% (F3 à 200 ppm). As frações F3 a 400 ppm e F4 à 800 ppm apresentaram efeito estimulatório, 7% e 5% respectivamente. A fração mais ativa foi a F2, apresentando índice de inibição de 100% a 200 e 400 ppm e de 81% à 800 ppm. As frações F5, F6, F8 e F9 obtiveram também altos índices de inibição, variando de 57% a 100%. A fração F7 teve inibição de 100% a 800 ppm, porém nas demais concentrações a inibição foi menor. Muitas das frações obtiveram índice inibitório maior do que o do herbicida comercial Glifosato, podendo vir a ser potenciais fontes de produtos naturais herbicidas como aplicação alternativa aos comerciais, porém com menor impacto ambiental.

Na parte radicular a fração F4 foi a que apresentou menor efeito inibitório, variando de 18% (200 ppm) à 29 % (400 ppm). A fração F8 foi a que obteve maior índice inibitório, seguida de F2. Ambas obtiveram inibição de 100% a 200 e 400 ppm e de 93% para F2 e 99% para F8 à 800 ppm. As frações F1 e F3 foram inibitórias somente a 800 ppm, 74% e 73% respectivamente. Todas as demais frações obtiveram altos índices de inibição, variando de 81% a 100%.

A ausência de compostos fitotóxicos nas frações F1, F3 e F4 poderia ser uma explicação para a baixa atividade que tais frações apresentaram na parte aérea. Outra justificativa possível é o fato de que em alguns casos, durante o fracionamento, a atividade pode ser perdida por modificações químicas ou degradação, além da questão do sinergismo de frações e produtos ativos que se está estudando (Dayan & Duke, 2006).

Há trabalhos que mostram que com o fracionamento de um extrato, a atividade inibitória tende a aumentar, como foi observado, uma vez que os compostos encontram-se mais separados e concentrados. Na avaliação do potencial alelopático de *Caryocar brasiliense* através de extrato metanólico de suas folhas, Moreira e colaboradores (2008) observaram que na concentração máxima da solução aquosa do extrato metanólico bruto (150 ppm), a porcentagem de inibição do crescimento da raiz de *Panicum maximum* foi de 56%. Os autores concluíram através do fracionamento cromatográfico do extrato bruto que as frações obtidas usando diclorometano e metanol apresentaram maior atividade inibitória no crescimento da raiz de *P. maximum*, 75% a 200 ppm e 60% à 150 ppm respectivamente.

Em estudos da atividade fungitóxica de *Caryocar brasiliense*, Marques e colaboradores (2002) constataram que os extratos brutos metanólicos das folhas, dos botões florais e dos frutos de *C. brasiliense*, inibiam a germinação do fungo *Fusarium oxysporum*, demonstrando assim sua ação alelopática.

Purificação dos compostos ativos

As frações F2 (denominada A1), F5, F6 e F7 foram utilizadas para serem purificadas (Tabela 3).

Tabela 3. Frações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do extrato de acetato de etila, proveniente das folhas de *Caryocar brasiliense*, para purificação dos compostos.

Frações	**Massa (mg)**	**Eluente*(Hx:AcOEt)**	**Amostras**
2	36,3	50-60%	A1
5-6-7	82,8	70-100%	A2

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

A fração F8 não foi utilizada, mesmo sendo uma das mais ativas, por ter material insuficiente. A fração F9 chegou a passar por coluna cromatográfica, porém não houve êxito, já que não se conseguiu separar nenhum produto puro, o que pode ser explicado por essa fração ser oriunda de lavagem da coluna com metanol, assim contendo uma mistura muito grande de compostos. As frações F5, F6 e F7 foram unidas, por possuírem similaridade em CCD, para aumentar a massa total do produto, passando então a ser denominada A2. As frações F1, F3 e F4 não foram utilizadas por terem tido baixa atividade inibitória nos bioensaios.

Tratamento da Amostra 1

Para facilitar a identificação dos compostos presentes na amostra foi realizada a retirada da clorofila, acrescentando-se acetato de etila juntamente com carvão ativo (até a amostra ficar transparente). O uso de carvão ativo para a retirada de clorofila já foi realizado com sucesso em outros trabalhos (Moreira *et al*., 2008).

Tratamento da Amostra 2

Como a amostra 2 em análise por CCD apresentava mais de um produto, porém bem definidos, optou-se por montar uma coluna cromatográfica líquida da amostra para separação dos mesmos. Foram obtidas 58 alíquotas com volume médio de 40 ml. O volume dos eluentes usados no fracionamento pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4. Volume dos eluentes utilizados no fracionamento do agrupamento das frações 5, 6 e 7, provenientes do fracionamento do extrato de acetato de etila das folhas de *Caryocar brasiliense.*

Alíquotas	**Eluente***	**Volume do eluente**
1	30% Hx:AcOEt	100 ml
2	40% Hx:AcOEt	100 ml
3 a 8	50% Hx:AcOEt	200 ml
9 a 11	60% Hx:AcOEt	100 ml
12 a 16	65% Hx:AcOEt	100 ml
17 a 25	70% Hx:AcOEt	200 ml
26 a 35	80% Hx:AcOEt	200 ml
36 a 47	100% AcOEt	200 ml
48 a 55	50:50 Acetona: AcOEt	150 ml
56	100% Acetona	100 ml
57 e 58	100% MeOH	200 ml

* o eluente é a mescla de solvente em que a fração foi coletada durante o fracionamento em coluna cromatográfica. Hx: hexano; AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol.

Após análise via CCD, as alíquotas foram reunidas em 4 subfrações (F1-F4), de acordo com suas similaridades cromatográficas. As subfrações (Tabela 5) e a amostra 1 foram analisados através de RMN^{1}H, RMN ^{13}C e infravermelho. A análise dos compostos através de RMN e a comparação dos espectros gerados com a de compostos já conhecidos descritos na

literatura é uma prática comum para a identificação de substâncias (Souza Filho *et al*., 2005b, Santos *et al*., 2008).

Tabela 5. Subfrações obtidas a partir da cromatografia líquida por coluna do agrupamento das frações 5, 6 e 7, provenientes do fracionamento do extrato de acetato de etila das folhas de *Caryocar brasiliense*, para purificação dos compostos.

Subfrações	**Massa (mg)**	**Eluente* (Hx:AcOEt)**
1	9,1	50%
2	5,9	50-65%
3	7,5	70-100%
4	16,5	100%

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

A subfração 2 foi descartada durante as análises por ser constituída de mistura sem nenhum produto em evidência, dificultando a identificação dos compostos ali presentes, mesmo assim seus espectros estão sendo apresentados junto com os demais, visando mostrar um aspecto geral dos compostos encontrados nas subfrações analisadas (em anexo). Os espectros estão sendo analisados no Instituto de Química e aparentemente se tratam de triterpenos.

Existem relatos de estudos alelopáticos com as folhas de *Caryocar brasiliense* onde foi analisado o extrato metanólico através da CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas). Na fração obtida com o eluente diclorometano foram identificados os seguintes compostos: palmitato de metila, ácido palmítico, elaidato de metila, álcool insaturado *trans*- fitol e estearato de metila. Segundo o autor, como o palmitato de metila foi o composto encontrado em maior proporção, provavelmente foi o responsável pelas alterações na germinação, crescimento, fisiologia e bioquímica de *Bidens pilosa e Zea mays* (Oliva, 2006).

Os experimentos realizados comprovaram a ação alelopática de *Caryocar brasiliense,* sendo que os efeitos inibitórios sobre o gergelim aumentaram consideravelmente com o fracionamento do extrato de acetato de etila e possível isolamento de compostos, entretanto a identificação desses aleloquímicos é fundamental para o conhecimento de quais moléculas estão agindo nesse processo.

CONCLUSÕES

1- O extrato obtido com solvente acetato de etila foi considerado o mais apropriado para seguir fracionamento.

2- As frações 2 e 8 do fracionamento do extrato de acetato de etila foram as mais inibitórias e a fração 4 foi a menos inibitória do crescimento inicial das plântulas de gergelim.

3- A parte radicular foi mais afetada pelos efeitos alelopáticos do que a parte aérea nos bioensaios analisados.

4- O gergelim se mostrou uniforme e homogêneo na germinação, sendo uma boa espécie alvo para estudos alelopáticos.

5- *Caryocar brasiliense* apresentou efeitos alelopáticos sobre o gergelim, sendo que os efeitos inibitórios aumentaram consideravelmente com o fracionamento do extrato de acetato de etila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.D. 1995. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an economically valuable species of the Central brazilian Cerrados. *Economic Botany*, 49: 40-48.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(1): 90-97.

BEZERRA J.C.B.; SILVA I.A.; FERREIRA H.D.; FERRI P.H. E SANTOS S.C. 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalatia glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia* 73: 428-430.

CECHINEL FILHO, V. 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.

CENTENARO, C.; CORRÊA, L.G.P.; KARAS, M.J.; VIRTUOSO, S.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. 2009.Contribuição ao estudo alelopático de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B): 304-308.

CHON, S.U & KIM, Y.M. 2004. Herbicidal Potential and Quantification of Suspected Allelochemicals from Four Grass Crop Extracts. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 190: 145-150.

CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S.; JANG, H.; PYO, B., KIM, S. 2002. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, 21: 1077–1082.

CIPOLLINI, D.; STEVENSON, R.; ENRIGHT, S.; EYLES, A., BONELLO, P. 2008. Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. *Journal of Chemical Ecology*, 34:144–152.

CORREIA, N.; CENTURION, M., ALVES, P. 2005. Influencia de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. *Ciência Rural* , 35 (3):498-503.

DAYAN, F. E. & DUKE, S. O. 2006. Clues in the search for new herbicides. *In*: REIGOSA, M. J., PEDROL, N., GONZÁLEZ, L. *Allelopathy: A physiological process with ecological implications* (pp. 63-83).

DUKE S.O; ROMAGNI J.G, DAYAN F.E. 2000. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection,* 19:583–589.

HERNÁNDEZ-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.

INDERJIT & DEL MORAL, R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *Botanical Review,* 63: 221-230.

INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M. 1990. The nature of the interference potential of *Pluchea lanceolata* (DC) Clarke,C.B. (Asteraceae). *Plant and Soil,* 122: 298-302.

KERR, W.E.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, B. 2007. Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(1): 169-171.

LIMA, J.M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.G., SILVA, M.B. 2009. Phytochemical prospecting of *Sonchus oleraceus* and its toxicity to *Artemia salina, Planta Daninha,* 27 (1): 7-11.

MACIAS, F.A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARIN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N., MOLINILLO, J.M.G. 2008. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Reviews* , 7:179–194.

MACIAS, F. A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D., VELASCO, R.F. 2000. Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models. 2. Guaianolides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48*:* 5288-5296.

MARQUES, M.C.S; CARDOSO, M.G; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.O. 2002. Efeito fungitóxico dos extratos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria, Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum. Ciência Agrotécnica*: 1410-1419.

MOREIRA, P.F.S.D.; SOUZA, D.R., HERNANDEZ-TERRONES, M.G. 2008. Avaliação do potencia alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocar brasiliense Camb.* (pequi) na inibição do desenvolvimento da raiz em sementes de *Panicum maximum. Biosci. J.*, 24 (3)**:** 74-79.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. 2003. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina***.** *Química Nova,* 26 (3): 309-311.

OLIVA, K.M.F. 2006. Atividade alelopática de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre a germinação,crescimento e aspectos bioquímicos e fisiológicos em *Bidens pilosa, Glycine Max e Zea mays.* Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa -UFV. 82p.

OLIVEIRA, M.M.; SAMPAIO, R.P.; GIORGI, W.; GILBERTI, B., MORS, W.B. 1970. *Caryocar brasiliense*-isolamento e identificação de algumas substâncias com atividade biológica sobre o sarcoma 180. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 37:25-27.

PASSOS, X. S.; CASTRO, A.C.M.; GARCIA, A.C.F.; CAMPOS, F.C.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H., SILVA, M.R. 2003. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliense*. *Pharmaceutical Biology,* 41(5) 319-324.

PERES, M.T.L.P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.C.; BONANI, V.F.L.; CANDIDO, A.C.S.; CASTELLI, C.; POPPI, N.R.; HONDA, N.K.; CARDOSO, C.A.L., FACCENDA, O. 2009. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). *Química Nova,* 32 (4): 897-901.

PEREZ, F.J. 1990. Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* e *A. fatua*. *Phytochemistry*, 29: 773-776.

PUTNAM, A.R. 1985. Weed allelopathy. *In*: DUKE, S.O (Ed.) Weed Physiology**:** Reproduction and Ecophysiology. Boca Raton, Florida: CRC Press, p.131–155.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. 1999. Ecophysiological Approach in Allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5): 577 - 608.

RIBEIRO, R.F. 2000. Pequi, o rei do cerrado: roendo o fruto sertanejo de todos os lados. Rede Cerrado/Campo Vale. 62 p.

RIMANDO, A.M.; OLOFSDOTTER, M.; DAYAN, F.E., DUKE, S.O. 2001. Searching for rice allelochemicals: an example of bioassay-guided isolation. *Agronomy Journal* 93: 16-20.

SALATINO, A.; MONTENEGRO, G. & SALATINO, M.L.F. 1986. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 117-124.

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.; 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.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. 2006. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta daninha* ,24 (4): 649-656.

SOUZA FILHO, A.P.S.; LÔBO, L.T.; ARRUDA, M.S.P. 2005a. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla* (Leg.- Pap.) Planta Daninha, 23(4):557-564.

SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. 2005b. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola. Planta Daninha*, 23 (1): 25-32.

STOWE, L. G. & KIL, B. S. 1981. The role of toxins in plant-plant interactions. *Handbook of Natural Toxins, 1*: 707-741.

Capítulo 2

Efeitos alelopáticos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) incorporado ao solo no crescimento de quatro espécies alvo

Efeitos alelopáticos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) incorporado ao solo no crescimento de quatro espécies alvo

RESUMO

Bioensaios de alelopatia conduzidos em laboratório devem, na medida do possível, reproduzir o mais próximo possível condições observadas em campo. O objetivo desse trabalho foi determinar efeitos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* (pequi) incorporado ao solo, sobre o crescimento inicial de sorgo, gergelim, braquiária e ipê roxo. Folhas maduras foram coletadas e secas em estufa à 50ºC por 24 horas, sendo posteriormente incorporadas ao solo nas concentrações 0,75%, 1,5% e 3% (p/v). Para bioensaios, foram colocadas 4 sementes previamente germinadas das espécies alvo em cada pote, sendo 8 potes (replicatas) por tratamento, totalizando 32 plântulas por tratamento. O experimento foi conduzido sob temperatura de 30ºC e fotoperíodo de 12 horas. Após 5 (sorgo e braquiária) e 7 dias (gergelim e ipê) de crescimento foram medidos os comprimentos da parte aérea e radicular das plântulas com um paquímetro digital. Em relação ao controle (solo sem triturado), observou-se leve estímulo no crescimento da parte aérea do sorgo e do ipê na concentração de 0,75%. Foi observado efeito dose dependente dos tratamentos, sendo este discreto para o gergelim. A parte radicular foi mais afetada pelos tratamentos que a parte aérea. Observou-se escurecimento de partes radiculares nas plântulas de sorgo, gergelim e braquiária, sugerindo necrose nos tecidos. Gergelim se mostrou a espécie mais sensível aos tratamentos, tanto na parte aérea quanto na parte radicular, e todas as espécies alvo apresentaram redução do crescimento, independentemente de serem invasoras ou cultivadas, mono- ou dicotiledôneas. Conclui-se que folhas de *C. brasiliense* apresentam potencial para exercer efeitos alelopáticos sob condições de campo.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, alelopatia, solo.

Allelopathic effects of crushed leaves of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) incorporated into the soil on the growth of four target species

ABSTRACT

Allelopathy bioassays conducted under laboratory conditions should, as far as possible, reproduce environmental conditions faced by the plants in the field. The aim of this study was to determine effects of leaves of *Caryocar brasiliense* incorporated to the soil on seedling growth of sorghum, sesame, brachiaria and ipê. Mature leaves were harvested, dried at 50° C for 24 hours, slightly crushed and subsequently incorporated into Cerrado latossoil at proportions of 0.75%, 1.5% and 3% (w/v). For bioassays, four germinated seeds of each species were placed per pot, 8 pots (replicates) per treatment, totaling 32 seedlings of each target species per treatment. The experiment was conducted at a temperature of 30 ° C and a photoperiod of 12 hours. After 5 (sorghum and brachiaria) and 7 days (sesame and ipê) of incubation, shoots and roots of all seedlings were measured with a caliper and compared to the control (soil without crushed leaves). A slight stimulation of shoot growth of sorghum and ipê at concentration of 0.75% was observed, in comparison to control. At higher concentrations the effects on seedling growth were mostly inhibitory, and the roots were more affected by the treatments than the shoots. A darkening of the root parts in the seedlings of sorghum, sesame and brachiaria was observed, suggesting tissue necrosis. Sesame was found to be the most sensitive species. Irrespective the species habits or taxonomic group, all the target species showed reduced growth in the presence of crushed leaves. We conclude that leaves of *C. brasiliense* mixed to the Cerrado soil have allelopathic potential to act upon seedling growth under field conditions.

Keywords: *Caryocar brasiliense*, allelopathy, soil.

INTRODUÇÃO

Bioensaios de laboratório podem estabelecer se uma planta tem potencial alelopático, entretanto para se ter a confirmação de que o potencial alelopático observado é expresso em condições naturais, são necessários estudos de campo (Inderjit & Dakshini 1995).

Segundo Stowe (1979), espécies comprovadamente alelopáticas em experimentos de laboratório quando em condições mais próximas às do ambiente natural podem vir a não apresentar este efeito, e substâncias que são inibitórias em solução aquosa não são necessariamente inibitórias no solo.

Inderjit e colaboradores (2001) relataram que a incorporação de resíduos de plantas ao solo está mais perto das condições de campo do que a aplicação de extratos aquosos, porém para os resultados serem relevantes o solo deve ter textura semelhante ao do habitat natural da planta (Inderjit & Dakshini, 1995). Depois de entrar no solo, processos como a retenção (absorção), transporte e transformação determinam a persistência e destino de aleloquímicos (Cheng, 1995).

Trabalhos recentes com diversas espécies doadoras tem se preocupado em simular condições mais próximas ao natural. Jarchow & Cook (2009), buscaram determinar através de experimentos com solo se a alelopatia pode ser um dos componentes da invasividade de *Typha augustifolia*, uma planta invasora da América do Norte, sendo que os resultados obtidos comprovaram que o sucesso de ocupação de tal planta se deve à atividade alelopática por ela exercida.

Viard-Crétat e colaboradores (2009) realizaram um experimento que consistia em simular a ação do lixiviado de *Festuca paniculata* sobre duas espécies alvo nativas e sobre ela própria, através de vasos plantados com a espécie doadora que eram irrigados por cima e a água com os lixiviados irrigavam os vasos com as espécies alvo. Os lixiviados reduziram a biomassa das plântulas das outras espécies, mas não afetaram a própria espécie em estudo.

Kumar e colaboradores (2009) avaliaram o possível papel da alelopatia na supressão da germinação de *Amaranthus powellii*, uma erva, após a incorporação de trigo ao solo. Ao fim do experimento concluiu-se que a germinação de *A. powelli* é influenciada pelos efeitos interativos dos aleloquímicos do trigo e do ambiente do solo.

Estudos alelopáticos utilizando substrato solo com espécies do Cerrado são escassos (Souza *et al*., 2007; Silva *et al*., 2006). A maior parte do bioma Cerrado é dominada por Latossolos, mas um número significativo de outras classes de solos (Neossolos, argissolos, nitossolos, entre outros) em associação com as condições de clima, favorece o estabelecimento de grande diversidade de espécies vegetais, seja do estrato graminoso, seja do

arbóreo (Reatto *et al.*, 2008). Os Latossolos possuem alta permeabilidade a àgua, mais de 95% desses Latossolos são distróficos e ácidos, com nível de pH em torno de 4 a 5,3 (Lopes, 1984), elevada saturação de Al e deficiência em P, Ca, K e Mg (Araújo & Haridasan, 1988).

Nos estudos alelopáticos de uma maneira geral, tanto em substrato solo como em papel de filtro, são utilizadas uma grande variedade de espécies alvo. Algumas espécies, como por exemplo *Lactuca sativa* L. (alface) e *Solanum lycopersicum L*. (tomate), são mais sensíveis à ação dos aleloquímicos do que outras, sendo utilizadas com freqüência em bioensaios alelopáticos (Ferreira & Áquila, 2000).

Sementes de gergelim também têm sido amplamente utilizadas em bioensaios (Ribeiro *et al*., 2009; Souza *et al*., 2007; Aires *et al*., 2005) por possuírem alta velocidade de germinação, serem de fácil aquisição e possuírem amplo espectro germinativo quanto à temperatura (Carvalho *et al.* 2001). Sementes de espécies invasoras como *Bidens pilosa* (picão-preto), *Mimosa pudica* (malícia) (Fortes *et al*., 2009; Lobo *et al*., 2008) e espécies cultivadas como *Lactuca sativa* (alface), *Sorghum bicolor* (sorgo) (França *et al*., 2008; Carmo *et al*., 2007; Souza *et al*., 2006) também são comumente usadas. O uso de sementes nativas como espécies alvo em bioensaios alelopáticos é menos freqüente, provavelmente devido à epoca restrita de dispersão, baixa longevidade e por comumente apresentarem algum tipo de dormência (Ferreira & Áquila 2000).

O pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) é uma espécie que ocorre sempre em agrupamentos mais ou menos densos em áreas de cerrado sentido restrito do DF, tendo seus frutos amplamente utilizados na culinária em comunidades tradicionais (especialmente em Goiás e Minas Gerais) e indígenas, que ainda hoje usam os frutos também como isca de caça e para pintura corporal (Ribeiro, 2000). É uma espécie que possui comprovados efeitos alelopáticos (Souza *et al*., 2007), porém os estudos ainda são escassos.

O objetivo deste trabalho foi determinar efeitos do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) incorporado ao solo, sobre o crescimento das espécies alvo *Sesamum indicum* L. (cultivada eudicotiledônea), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (cultivada monocotiledônea), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (nativa) e *Brachiaria decumbens* Stapf. (invasora).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das folhas de *Caryocar brasiliense*

Folhas maduras de indivíduos adultos de *Caryocar brasiliense* foram coletadas no campus da Universidade de Brasília e secas em estufa a 50 °C durante 24 horas. As folhas secas foram levemente trituradas em liquidificador com pulsos curtos e intermitentes e o triturado incorporado ao solo em diferentes concentrações, conforme descrito abaixo.

Espécies alvo

Foram utilizadas como espécies alvo sementes de gergelim- *Sesamum indicum* L. (eudicotiledônea cultivada), sorgo- *Sorghum bicolor* (L.) Moench (monocotiledônea cultivada), ipê roxo- *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.(nativa) e braquiária- *Brachiaria decumbens* Stapf. (invasora) previamente germinadas, em câmaras de germinação a 30 ºC em placas de Petri revestidas com papel de filtro e irrigadas com água destilada.

As sementes de ipê roxo foram coletadas de indivíduos presentes no campus da Universidade de Brasília. As sementes de gergelim foram obtidas de indivíduos plantados no Laboratório de Termobiologia-UnB, as sementes de sorgo foram cedidas gentilmente pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas-MG) e as sementes de braquiária foram obtidas comercialmente (Sementes Agrocosmos) .

Experimento de solo

Foram preparados potes de plástico com latossolo vermelho coletado do Cerrado. Este solo foi peneirado para retirada de impurezas e homogeneização do mesmo, sendo posteriormente seco ao ar para retirar a umidade existente.

As folhas maduras secas e trituradas de pequi foram misturadas ao solo nas proporções apresentas na Tabela 1. Foram colocadas 4 sementes previamente germinadas (plântulas) das espécies alvo em cada pote, sendo 8 potes (replicatas) por tratamento, totalizando 32 plântulas por tratamento.

Tabela 1. Proporção de solo e triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* em cada pote nos diferentes tratamentos.

Tratamento	**Volume de solo**	**Volume de folhas**
Controle	180g	Ausente
0,75 %	178,65g	1,35g
1,5 %	177,3g	2,7g
3 %	174,6g	5,4g

Foram colocados 2 potes em cada caixa gerbox contendo água destilada. Pequenos orifícios foram feitos na parte inferior dos potes, por onde o solo entrou em contato por capilaridade com a água, que era colocada nas gerbox diariamente. O experimento permaneceu em câmara de germinação à 30 ºC e fotoperíodo de 12 h, e após o período de crescimento (5 dias para sorgo e braquiária e 7 dias para gergelim e ipê), foram medidos os comprimentos da parte aérea e radicular das plântulas com um paquímetro digital.

Análise estatística

As análises estatísticas foram baseadas em testes paramétricos e não-paramétricos, dependendo dos resultados obtidos. Para dados paramétricos foi utilizada a análise da variância (ANOVA) comparando-se as médias usando o teste de Tukey a 5%. Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis comparando-se as médias usando o teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado para as análises foi o BioEstat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaio com *Sorghum bicolor* (sorgo)

Os resultados dos efeitos alelopáticos do triturado de folhas de pequi incorporado ao solo sobre o crescimento do sorgo podem ser visualizados na Figura1.

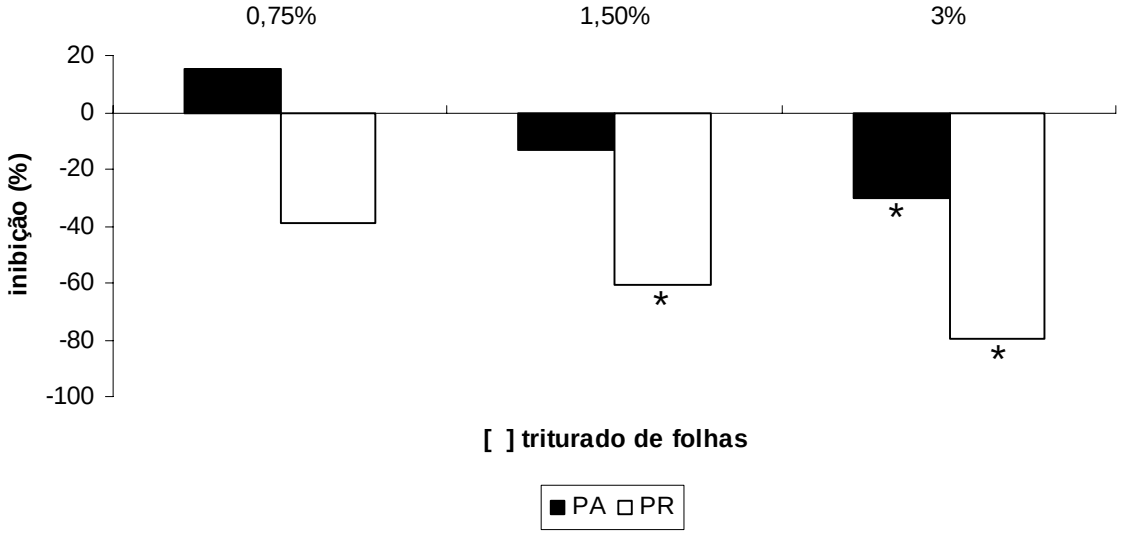


Figura 1. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sorghum bicolor* (sorgo) crescidas durante cinco dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. $p < 0,05$

Apesar de não ter diferido estatisticamente do controle, há uma tendência de estímulo em 15% da parte aérea a 0,75%, sendo que na parte radicular houve inibição de 40%.

Nas proporções 1,5% e 3% houve inibição no desenvolvimento das plântulas, sendo a parte radicular bem mais atingida, 60% e 80%, respectivamente. Houve também o surgimento de uma aparente necrose das raízes em todos os tratamentos (Figura 2).

Tongma e colaboradores (1998) realizaram vários estudos envolvendo solo com *Tithonia diversifolia* como espécie doadora e diversas espécies alvo, inclusive sorgo. Houve redução no crescimento das partes aéreas e radiculares de *Raphanus sativus, Sorghum bicolor, Digitaria ciliaris, Amaranthus viridis* e *Oryza sativa* quando plantadas em solo previamente plantado com *T. diversifolia.*O extrato aquoso das folhas de *T. diversifolia* aplicado ao solo também reduziu o crescimento da parte aérea e radicular das plantas alvo, sendo que essa inibição aumentou com o aumento da concentração do extrato. A incorporação de folhas secas ao solo, na proporção de 1% e 2% inibiu o crescimento das plântulas de arroz (única espécie usada neste experimento), sendo que a atividade observada diminuiu 4 semanas após o tratamento do solo, indicando uma possível degradação dos compostos por microorganismos.

Figura 2. Tratamentos com *Sorghum bicolor*

Bioensaio com *Sesamum indicum* (gergelim)

Os resultados dos efeitos alelopáticos do triturado de folhas de pequi incorporado ao solo sobre o crescimento do gergelim podem ser visualizados na Figura 3.

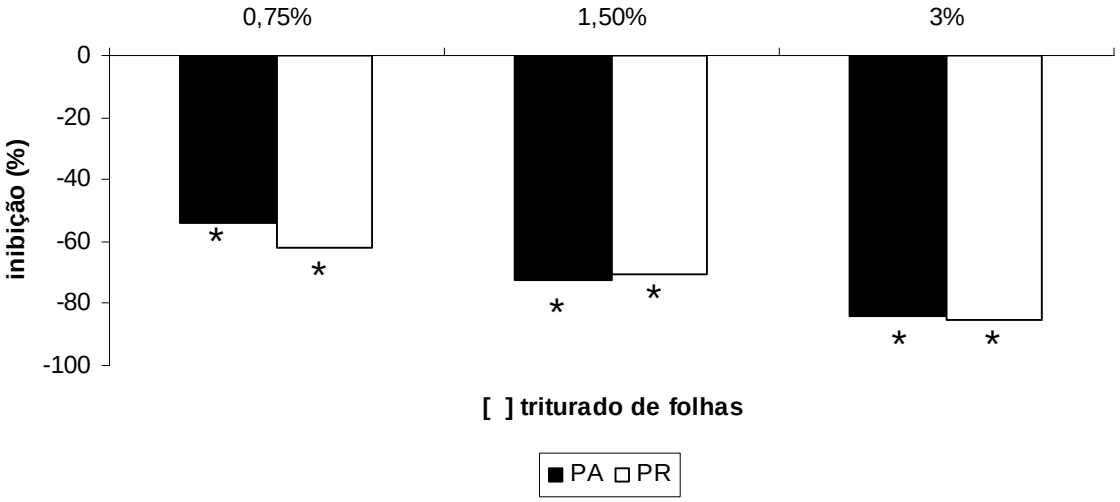


Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas durante sete dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. $p < 0,05$

No experimento realizado com gergelim como espécie alvo, houve inibição da parte aérea e radicular em todas as concentrações, como também ocorreu com a incorporação de restos foliares de *Ophiopogon japonicus* que afetou o crescimento das plântulas de alfafa e mostarda (Iqbal *et al*., 2004).

Na concentração mais baixa, 0,75%, a inibição foi a mais baixa, 54% na parte aérea e 62% para a parte radicular. O índice de inibição da parte aérea e da parte radicular foi acima de 70% para a concentração de 1,5% e acima de 80% para 3%. Algumas plântulas dos tratamentos 0,75% e 1,5% tiveram suas raízes aparentemente necrosadas, e na concentração 3% todas as raízes estavam com essa aparência (Figura 4).

No trabalho de Pina e colaboradores (2009) o triturado de folhas de *Eugenia dysenterica* incorporado ao solo nas concentrações de 1% e 3% também inibiram o crescimento das plântulas de gergelim, sendo a inibição da parte radicular superior à 90% e da parte aérea em torno de 50%.

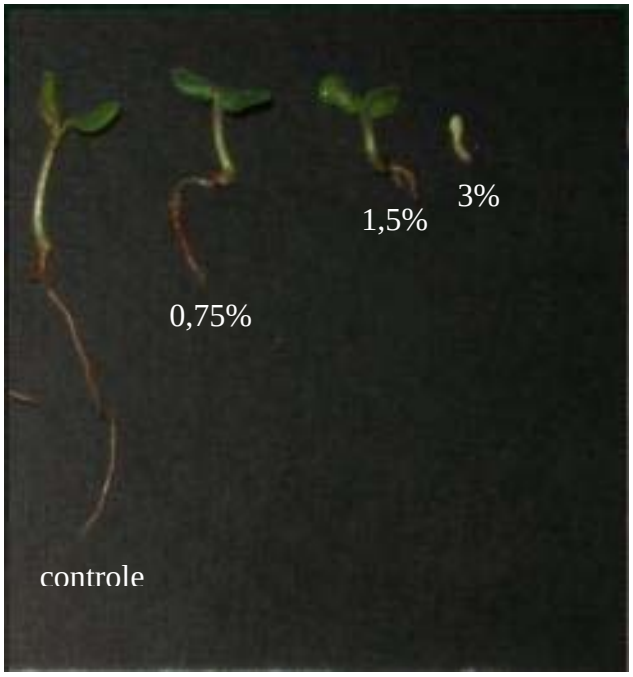


Figura 4. Tratamentos com *Sesamum indicum*

Bioensaio com *Brachiaria decumbens* (braquiária)

Os resultados dos efeitos alelopáticos do triturado de folhas de pequi incorporado ao solo sobre o crescimento da braquiária podem ser visualizados na Figura 5.

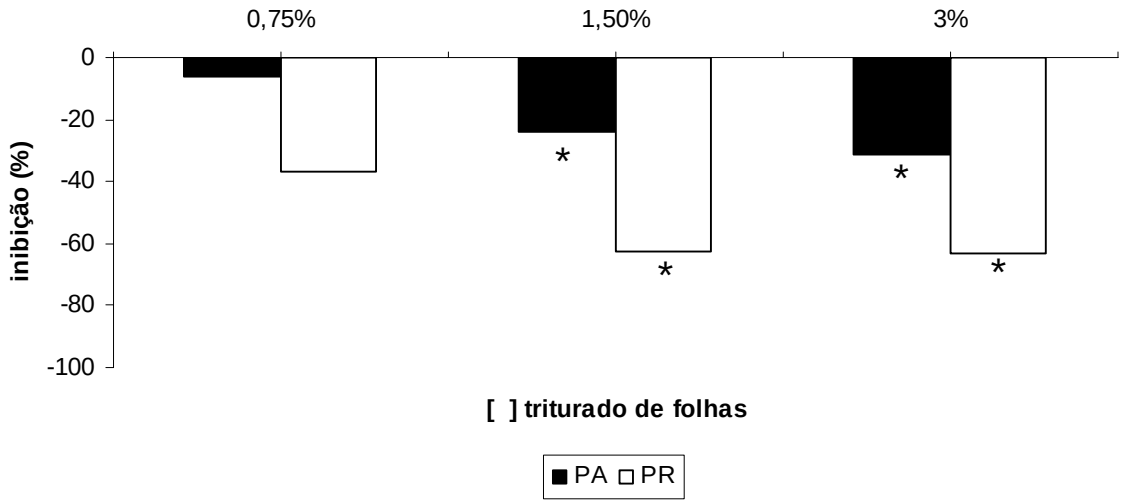


Figura 5. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Brachiaria decumbens* (braquiária) crescidas durante cinco dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. $p < 0,05$

A inibição da parte aérea para todos os tratamentos foi baixa apesar de ter sido significativo em relação ao controle para 1,5 % e 3 %, atingindo no máximo 30% de inibição. A parte radicular foi a mais inibida, variando de 36% a 63%, sendo que nos tratamentos 1,5 % e 3 % a inibição observada foi praticamente a mesma (Figura 6).

O controle apresentou grande quantidade de raízes laterais que foram diminuindo à medida que a concentração de triturados foi aumentando. Nos tratamentos de 1,5% e 3 % foi observada a presença de algumas raízes aparentemente necrosadas. Jerônimo (2006) em seus estudos com extratos de lobeira observou a redução no tamanho médio radicular, na presença de raízes laterais e de pêlos radiculares das plântulas de gergelim em contato com tais extratos.

Segundo Raven e colaboradores (2001), os efeitos na redução do tamanho radicular e na presença de raízes laterais podem afetar a absorção de nutrientes pelas plântulas, o que acaba por afetar o seu desenvolvimento.

Figura 6. Tratamentos com *Brachiaria decumbens*

Bioensaio com *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo)

Os resultados dos efeitos alelopáticos do triturado de folhas de pequi incorporado ao solo sobre o crescimento do ipê roxo podem ser visualizados na Figura 7.

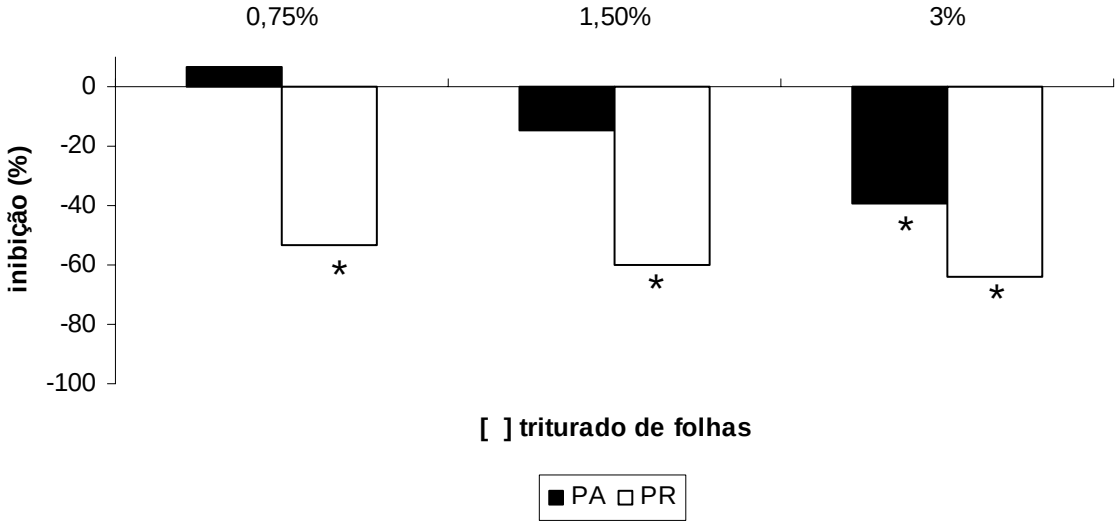


Figura 7. Porcentagem de inibição do crescimento da parte aérea e radicular das plântulas de *Tabebuia impetiginosa* (ipê) crescidas durante sete dias sob influência do triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* incorporado ao solo em diferentes concentrações.* Indica diferenças significativas em relação às médias de crescimento do controle. $p < 0,05$

A parte aérea das plântulas de ipê foi menos atingida do que a parte radicular, chegando a ter um leve estímulo no tratamento 0,75% e chegando ao máximo de 40 % de inibição na presença da maior concentração de triturado de folhas (3%). A inibição da parte radicular foi observada em todos os tratamentos, variando de 53% a 65% (Figura 8).

Nos experimentos com sorgo e ipê houve um leve estímulo da parte aérea no tratamento de 0,75%. Segundo Fernandez e colaboradores (2006), a inibição da raiz pode coincidir com o estímulo do crescimento do hipocótilo (parte aérea) e esse efeito inibitório e estimulatório em conjunto podem ser interpretados como resultado da ação direta de alterações moleculares ou como uma re-orientação de crescimento na tentativa de evitar o estresse do aleloquímico.

Figura 8. Tratamentos com *Tabebuia impetiginosa*

Com exceção do gergelim onde não houve grande diferença na inibição da parte aérea e radicular, nas demais espécies alvo testadas a parte radicular foi mais afetada pelos efeitos alelopáticos do que a parte aérea. Chung e colaboradores (2001) explicam o efeito inibitório mais acentuado sobre as raízes devido ao contato mais íntimo destas com a solução do aleloquímico, em relação à parte aérea. Outros trabalhos também constataram que as raízes são mais sensíveis aos aleloquímicos quando comparadas com a parte aérea das plantas (Pina *et al*., 2009; Abdelgaleil & Hashinaga 2007; Ercoli *et al.* 2007).

O escurecimento de partes radiculares que foi observado no sorgo, gergelim e braquiária também foi constatado em outros trabalhos (Borella *et al*., 2009; Aires, 2007; Maraschin-Silva & Áquila, 2006), e este escurecimento geralmente é associado a necroses. Entretanto, Jerônimo (2006) em seu trabalho conseguiu reverter o escurecimento das plântulas de gergelim tratadas com extrato de lobeira quando as mesmas foram lavadas e transferidas

para placas com água destilada. Tal escurecimento se deu provavelmente pelo acúmulo de fenóis, e não por necrose. Weir e colaboradores (2004) atribuem o escurecimento radicular a danos oxidativos causados pelos aleloquímicos.

No experimento com gergelim como espécie alvo, o efeito dose dependente foi discreto, sendo que a inibição da parte aérea no tratamento 1,5% foi discretamente superior à inibição da parte radicular. Para as demais espécies alvo testadas o efeito dose dependente se mostrou nítido, onde na medida em que se aumentou a concentração dos aleloquímicos disponíveis, conseqüentemente aumentou também o efeito inibitório observado. Este efeito dose dependente pôde ser observado com outras espécies. Em *Micromeria fruticosa*, à medida que se aumentou a concentração das folhas adicionadas ao solo o percentual de emergência das plântulas de trigo declinou acentuadamente, atingindo quase inibição completa a 2%. (Dudai *et al*., 2009). Uma redução significativa no crescimento das plântulas de *Brassica* sp. foi observado quando o solo estava incorporado com resíduos de *Parthenium hysterophorus*, sendo que esta redução acentuou com o aumento da concentração, atigindo o ápice à 4% (Singh *et al*., 2005).

Todas as espécies utilizadas mantiveram praticamente o mesmo padrão, maior inibição da parte radicular e efeito dose dependente. Segundo Macías e colaboradores (2000) os sistemas vivos apresentam uma grande variabilidade na sua resposta aos tratamentos, e um único agente pode induzir efeitos diferentes em diferentes espécies. Daí a importância de se testar o efeito alelopático em várias espécies de grupos distintos (cultivada, invasora, monocotiledônea,...), para maior confiabilidade dos resultados e observação de algum efeito seletivo.

A utilização de sementes pré germinadas confere uma maior homogeneização dos resultados, já que há uma padronização. Uma desvantagem de tal metodologia é que a análise dos resultados limita-se ao efeito no desenvolvimento das plântulas, não sendo observado portanto os efeitos alelopáticos sobre a germinação e velocidade da germinação. Em outros trabalhos também foi utilizada as sementes das espécies alvo pré germinadas nos experimentos (Kong *et al*., 2007; Souza *et al*., 2006). Embora a germinação da semente, em condições de campo, possa garantir o estabelecimento das espécies, o estágio de plântula é o período mais suscetível à influência de fatores externos, como a influência dos aleloquímicos (Adkins *et al*., 2007; Fenner, 2000).

Trabalhos de incorporação de partes vegetais ao solo e seu efeito alelopático têm sido demonstrado para várias espécies, inclusive dentro da faixa de proporção utilizada neste trabalho. A incorporação ao solo de resíduos de *Ambrosia trifida* nas concentrações 1%, 2% e

5% causou uma redução significativa no crescimento de plântulas de trigo a partir do 10º dia, chegando a 75% na concentração mais alta de resíduos (Kong *et al*., 2007).

Souza e colaboradores (2006) realizaram estudo com incorporação da parte aérea de *Brachiaria decumbens* ao solo também na proporção de 3%. A parte aérea seca e triturada foi coletada em estação seca e chuvosa e após incorporação ao solo foi observada a inibição das plântulas de milho, arroz, trigo, soja, feijão, algodão e da própria braquiária. Das sete culturas testadas, a própria *B. decumbens* apresentou maior sensibilidade aos efeitos de sua matéria seca e os efeitos inibitórios observados foram mais intensos para a braquiária coletada na estação chuvosa (Souza *et al*., 2006).

Um outro estudo foi realizado por Furness e colaboradores (2008), onde folhas de *Cynoglossum officinale* foram incorporadas ao solo na proporção de 2% e atrasaram a emergência das plântulas de *Koeleria macrantha*, *Agropyron cristatum* e *Festuca idahoensis* 4 dias após a semeadura dessas, inibindo a emergência em 85% (Furness *et al*., 2008).

Os produtos químicos ao entrarem na solução do solo podem ser absorvidos pelas plantas, mas também estão sujeitos a processos de degradação, como fotólise, oxidação e degradação microbiana, e aos processos de remoção ou transferência, como volatilização e adsorção (Weber & Miller, 1989; Weber *et al*., 1986). Portanto, vários fatores de solo, como textura, matéria orgânica e inorgânica, umidade e organismos, afetam a atividade alelopática através dos seus efeitos não só no comportamento dos aleloquímicos no solo, mas também no crescimento das plantas doadoras e receptoras, resultando em diferentes atividades fitotóxicas (Kobayashi, 2004).

Os resultados demonstraram atividade alelopática das folhas de pequi quando incorporadas ao solo, sendo que o gergelim se mostrou mais sensível à ação dos aleloquímicos, tanto na parte aérea quanto na parte radicular, do que as demais espécies testadas.

CONCLUSÕES

1- Concentrações mais baixas de resíduos foliares de *Caryocar brasiliense* podem causar um leve estímulo do crescimento inicial da parte aérea de sorgo e ipê.

2- A parte radicular foi mais afetada pelos efeitos alelopáticos do que a parte aérea.

3- O triturado de folhas de *Caryocar brasiliense* pode causar escurecimento de partes radiculares, como observado no sorgo, gergelim e braquiária.

4- O efeito dose dependente se mostrou nítido.

5- O gergelim se mostrou a espécie mais sensível à ação dos aleloquímicos, tanto na parte aérea quanto na parte radicular, e a braquiária a espécie menos sensível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S. & HASHINAGA, F. 2007. Allelopathic potencital of two sesquiterpene lactones from Magnolia grandiflora L. *Biochemical Systematics and Ecology* , 35 (11): 737-742.

ADKINS, S., ASHMORE, S., & NAVIE, S. 2007. *Seeds: biology, development and ecology.* Cambridge: CAB International.

AIRES, S.S. 2007. Potencial alelopático de espécies nativas do Cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras. Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília. 61p.

AIRES, S.S.; FERREIRA, A.G.; BORGETTI, F**.** 2005**.** Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. *Acta Botanica Brasílica,* 19(2): 339-344.

ARAÚJO, G.M. & HARIDASAN, M. 1988. A comparison of the nutritional status of two forest communities on mesotrophic and dystrophic soils in Central Brazil. *Soil Science and Plant Analysis,* 19:1075-1089.

BORELLA, J., WANDSCHEER, A.C.D., BONATTI, L.C., PASTORINI, L.H. 2009. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências, 7 (3): 260-265.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L., TAKAKI, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botânica. Brasílica,* 21 (3): 697-705.

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.

CHENG, H.H. 1995. Characterization of the mechanisms of allelopathy: Modeling and experimental approaches. *In*: Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. INDERJIT DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (Eds.).

CHUNG, I. M.; AHN, J. K., YUN, S. J. 2001. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, 20 (10): 921-928.

DUDAI, N.; CHAIMOVITSH, D.; LARKOV, O.; FISCHER, R.; BLAICHER, Y., MAYER, A.M. 2009. Allelochemicals released by leaf residues of *Micromeria fruticosa* in soils, their uptake and metabolism by inhibited wheat seed. *Plant and soil*, 314:311–317.

ERCOLI, L.; MASONI, A.; PAMPANA, S.; ARDUINI, I. 2007. Allelopathic effects of rye, brown mustard and hairyn vetch on redroot pigweed common jambsquarter and knotweed. *Allelopathy Journal* , 19 (1): 249-256.

FENNER, M. 2000 *Seeds-The Ecology of regeneration in plant communities.* New York: Cambridge University Press.

FERNANDEZ, C.; LELONG, B.; VILA, B.; MÉVY, J.-P.; ROBLES, C.; GREFF, S.; DUPOUYET, S., BOUSQUET-MÉLOU, A. 2006. Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an experimental approach. *Chemoecology* , 16: 97-105.

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

FORTES, A.M.T.; MAULI, M.M.; ROSA, D.M.; PICCOLO, G.; MARQUES, D.S., REFOSCO, R.M.C. 2009. Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de picão-preto e soja Acta Scientiarum. Agronomy, 31 (2): 241-246.

FRANÇA, A.C.; SOUZA, I.F.; SANTOS, C.C.; OLIVEIRA, E.Q.; MARTINOTTO, C. 2008. Atividades alelopáticas de nim sobre o crescimento de sorgo, alface e picão-preto. *Ciência e agrotecnologia* , 32 (5): 1374-1379.

FURNESS, N.H., ADOMAS, B., DAI, Q, LI, S., UPADHYAYA, M. K. 2008. Allelopathic Influence of Houndstongue (*Cynoglossum officinale*) and Its Modification by UV-B Radiation. *Weed Technology* , 22:101–107.

INDERJIT; KAUR M., FOY C.L. 2001. On the significance of field studies in allelopathy. *Weed Technology,* 15**:** 792–897.

INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review,* 61: 28-44.

IQBAL, Z.; FURUBAYASHI, A., FUJII, Y. 2004.Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants. *Weed Biology and Management,* 4: 43–48.

JARCHOW, M.E. & COOK, B.J. 2009. Allelopathy as a mechanism for the invasion of *Typha angustifólia* .Plant EcolOGY, 204:113–124.

JERÔNIMO, C.A. 2006. Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St.Hill no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L. Dissertação de mestrado. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília. 91p.

KOBAYASHI K. 2004. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil.*Weed Biology and Management,* 4:1–7.

KONG, C., WANG, P., XU, X.. 2007. Allelopathic interference of *Ambrosia trifida* with wheat (*Triticum aestivum*). *Agriculture, Ecosystems and Environment,* 119 : 416–420 .

KUMAR, V.; BRAINARD, D.C.; BELLINDER, R.R. 2009. Suppression of Powell Amaranth (Amaranthus powellii) by Buckwheat Residues: Role of Allelopathy Weed Science, 57: 66–73.

LOBO, L.T.; CASTRO, K.C.F.; ARRUDA, M.S.P.; SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; ARRUDA, G.M.S.P.; SANTOS, A.S.; SOUZA FILHO, A.P.S. 2008.

Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). *Química. Nova*, 31 (3): 493-497.

LOPES, A.S. 1984. Solos sob cerrados: características, propriedades e manejo. POTAFOS, 162p.

MACIAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. 2000.Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species *Journal of Agricultural Food Chemistry***,** 4*:* 2512-2521.

MARASCHIN-SILVA, F. & AQUILA, M.E.A., 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Acta Botânica Brasílica, 20(1): 61-69.

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): 313-322.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. 2001. Biologia Vegetal. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan.

REATTO, A.; CORREIA,J.R.; SPERA, S.T.; MARTINS, E.S. Solos do bioma Cerrado-Aspectos pedológicos. 2008. *In*: Cerrado- Ecologia e Flora. SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO,J.F. Embrapa.

RIBEIRO, J.P. N.; MATSUMOTO, R.S.; TAKAO, L.K.; VOLTARELLI, V.M., LIMA, M.I. 2009. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L.. *Revista Brasileira de Botânica*, 32 (1): 183-188.

RIBEIRO, R.F. 2000. Pequi, o rei do cerrado: roendo o fruto sertanejo de todos os lados. Rede Cerrado/Campo Vale. 62 p.

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.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; PANDHER, J.K., KOHLI, R.K. 2005. Phytotoxic effects of *Parthenium hysterophorus* residues on three *Brassica* species. *Weed Biology and Management,* 5: 105–109.

SOUZA, L.M.; CANINI, G.B.; AIRES, S.S.; BORGHETTI, F. 2007. Efeito alelopático de folhas de quatro espécies do Cerrado sobre crescimento de gergelim. *Revista Brasileira de Biociências,* 5(2): 540-542.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D. e ROSOLEM, C.A. 2006. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. *Planta daninha,* 24 (4): 657-668.

STOWE, L.G. 1979. Allelopathy and its influence on the distribution of plants in an Illinois oldfield. *Journal of ecology,* 67: 1065-1085.

TONGMA, S., KOBAYASHI, K., USUI, K. 1998. Allelopathic Activity of Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in Soil. *Weed Science,* 46 (4): 432-437.

VIARD-CRETAT, F.; GALLET, C.; LEFEBVRE, M.; LAVOREL, S. 2009. A leachate a day keeps the seedlings away: mowing and the inhibitory effects of *Festuca paniculata* in subalpine grasslands. *Annals of Botany,* 103: 1271–1278.

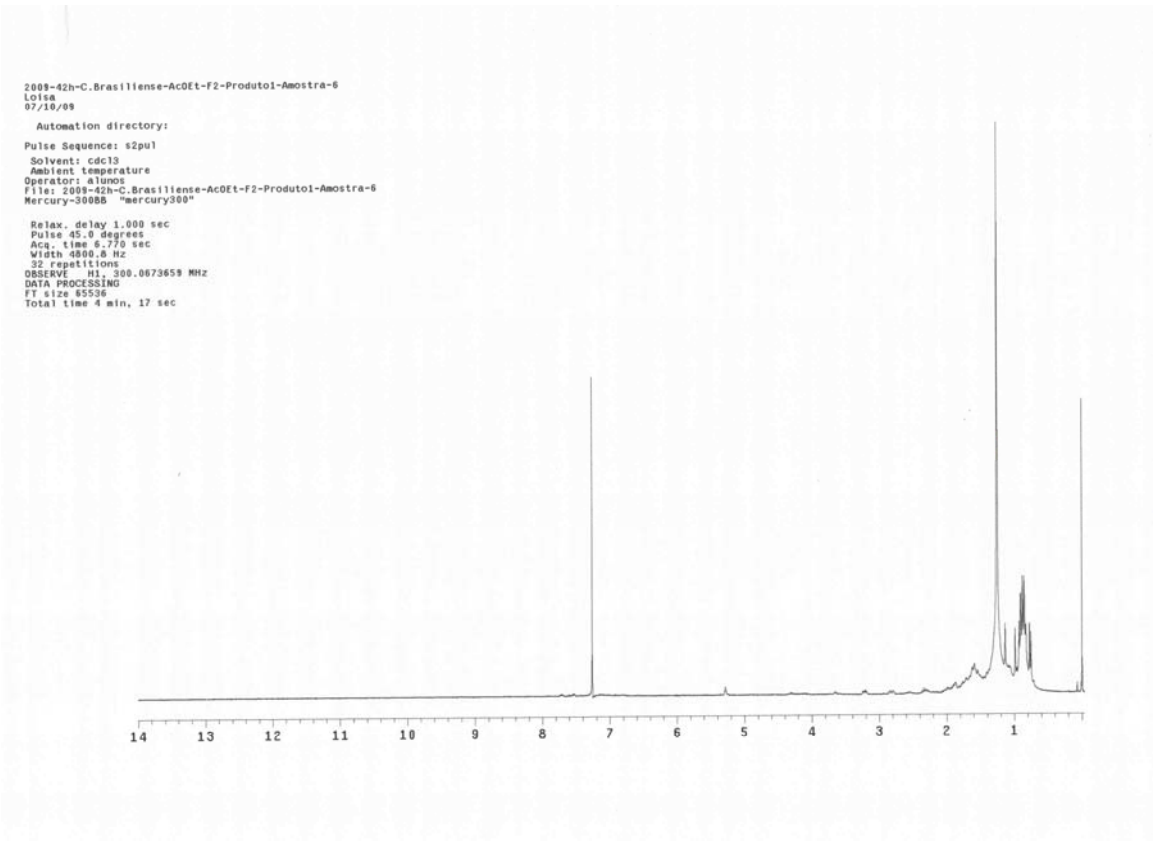
WEBER, J.B. & MILLER, C.T. 1989. Organic chemical movement over and through soil. *In*: SAWHNEY, B.L., BROWN, K.W. (eds.). Reactions and movement of organic chemicals in soils (SSSA Special Publication n. 22). Madison: Soil Science Society of America, 305-334.

WEBER, J.B.; SWAIN, L.R., STREK, H.J. 1986. Soil, herbicide sorption and model plant-soil systems. *In*: CAMPER, N.D. (ed.). Research methods in weed science. Champaign: SWSS, 155-188.

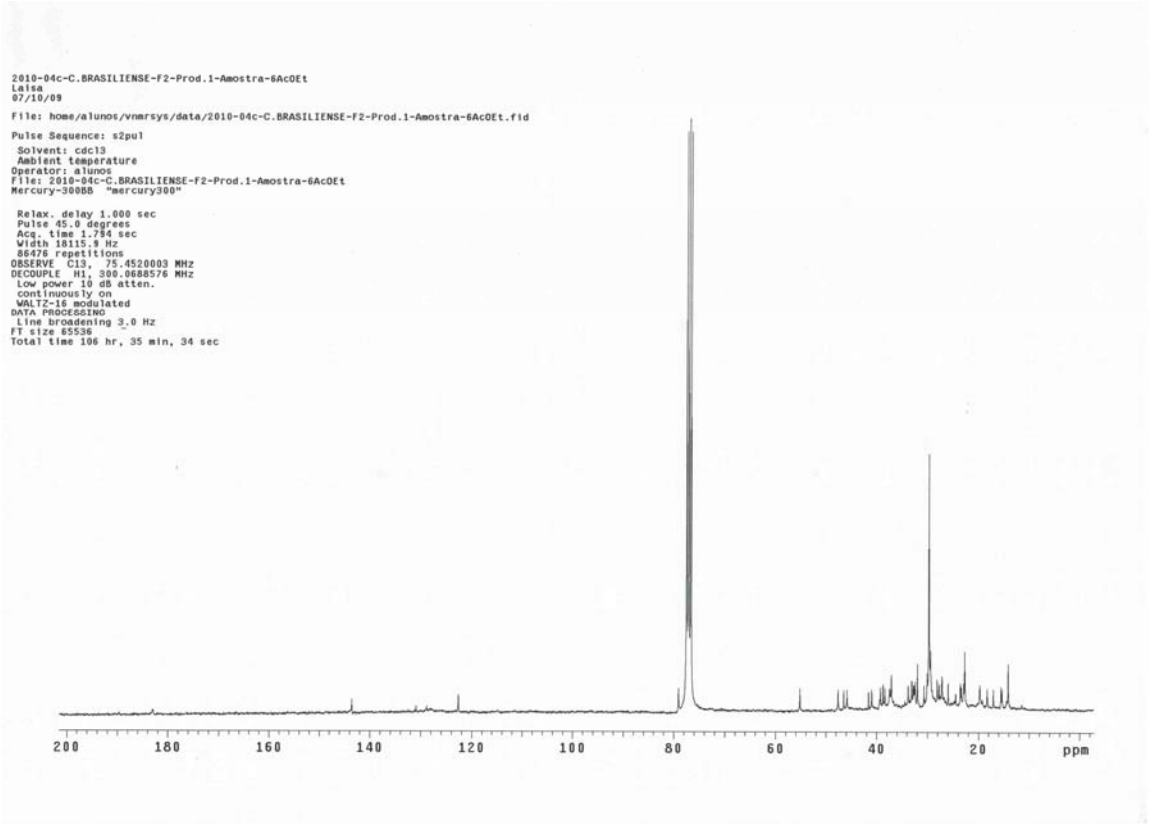
WEIR, T.L., PARK, S., VIVANCO,J.M., 2004. Biochemical and physiological mechanisms by allelochemicals. Current opinial in Plant Biology. 7: 472-479.

ANEXO

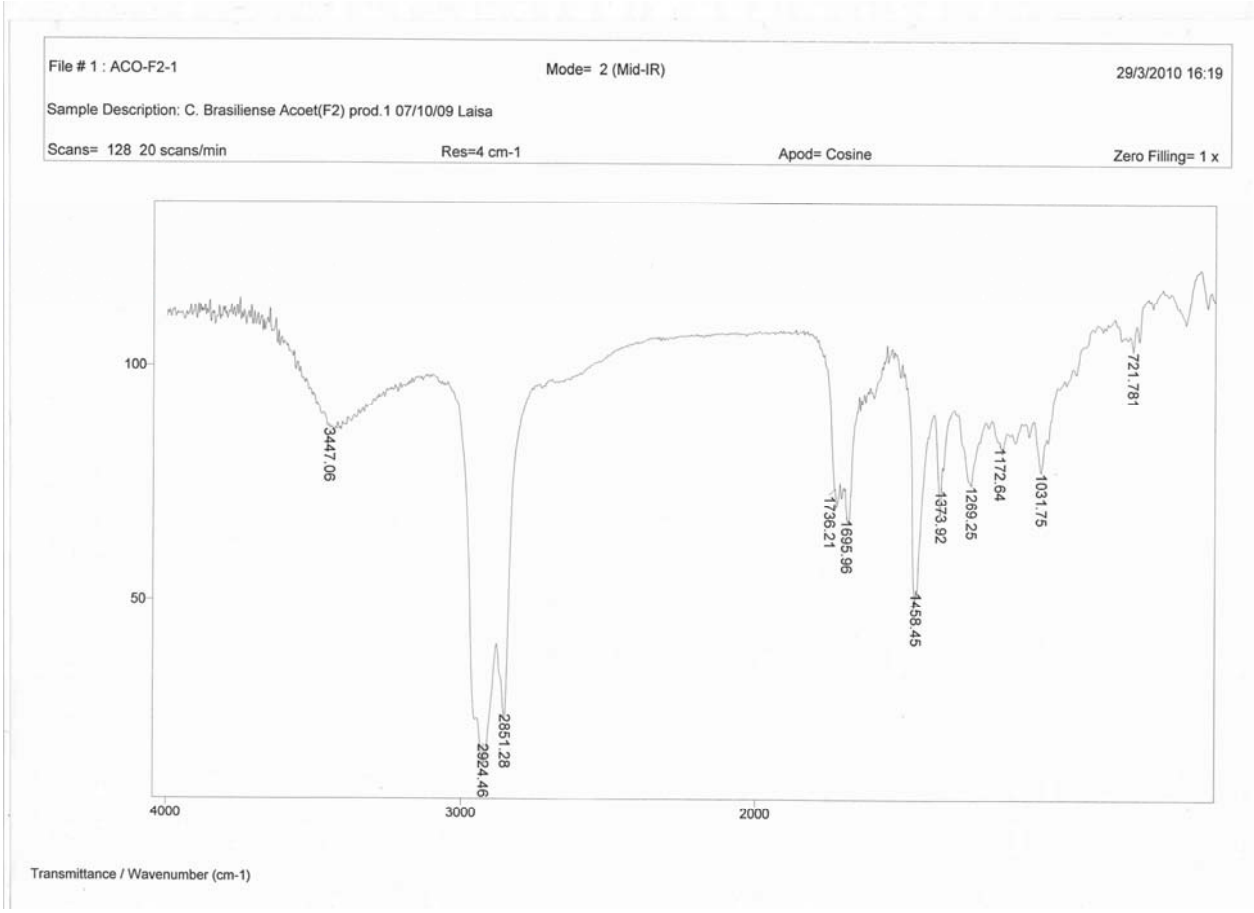
Espectros de RMN ^{1}H, RMN ^{13}C e infravermelho



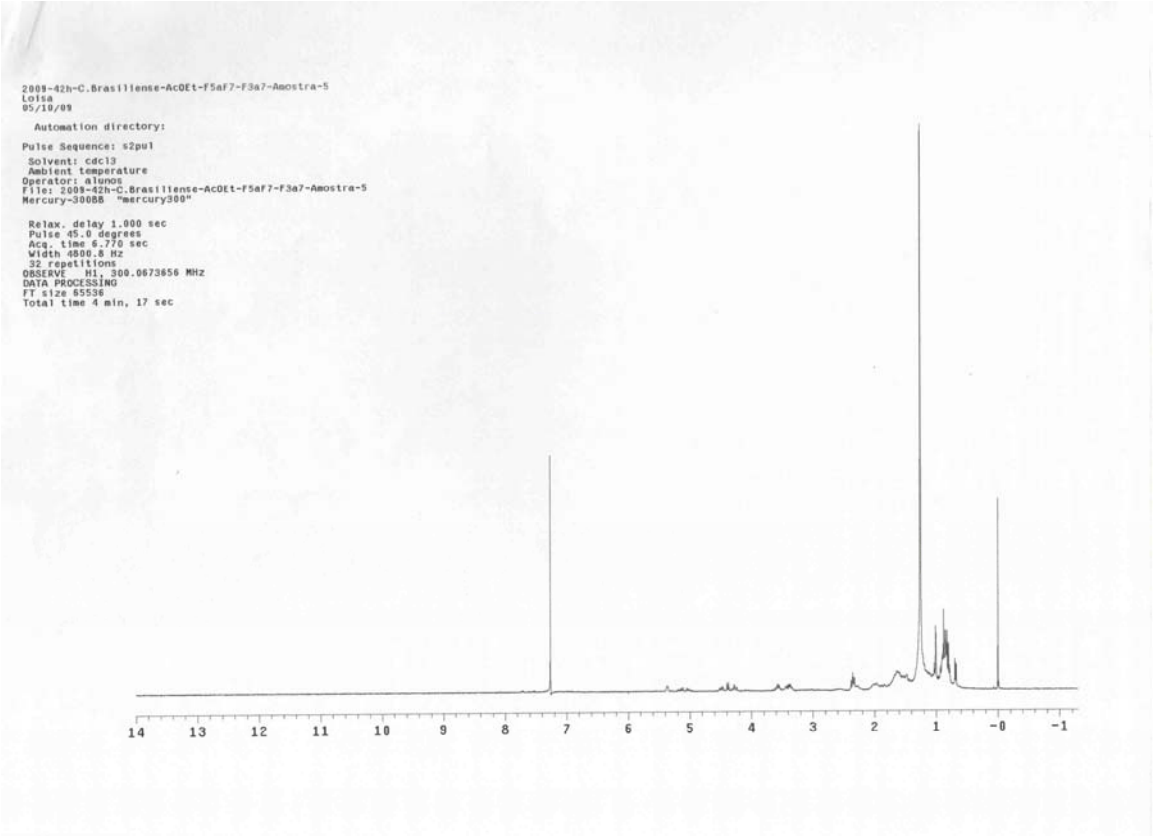
RMN ^{1}H da fração 2 (amostra 1)



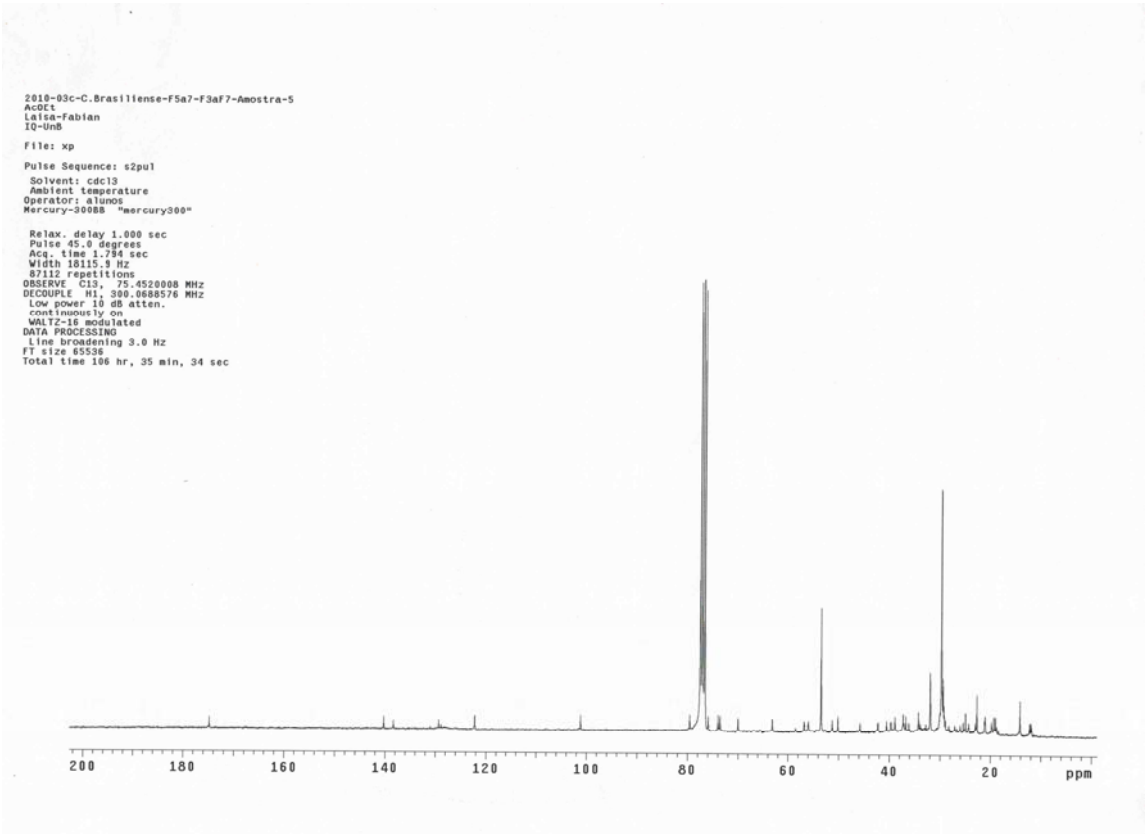
RMN ^{13}C da fração 2 (amostra 1)



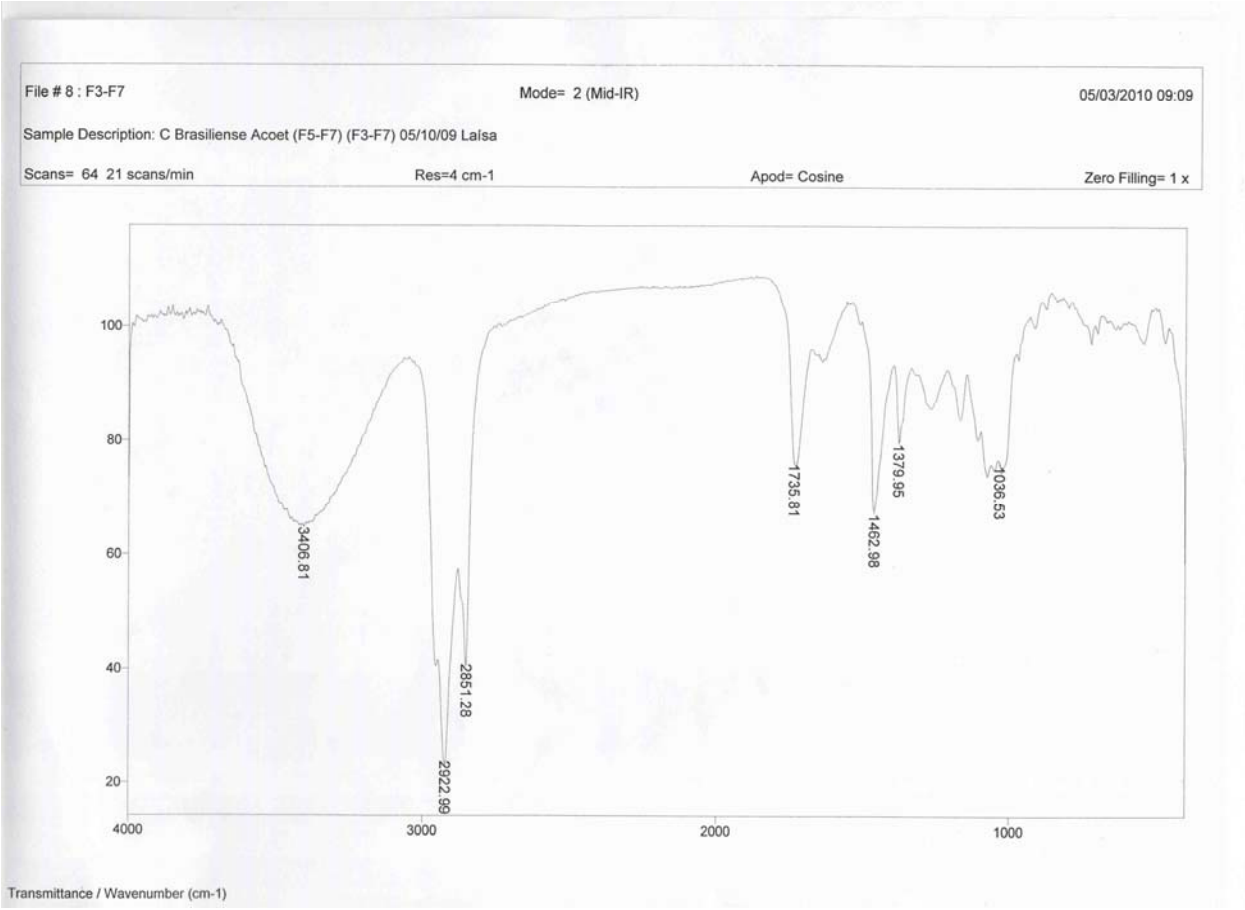
Infravermelho da fração 2 (amostra 1)



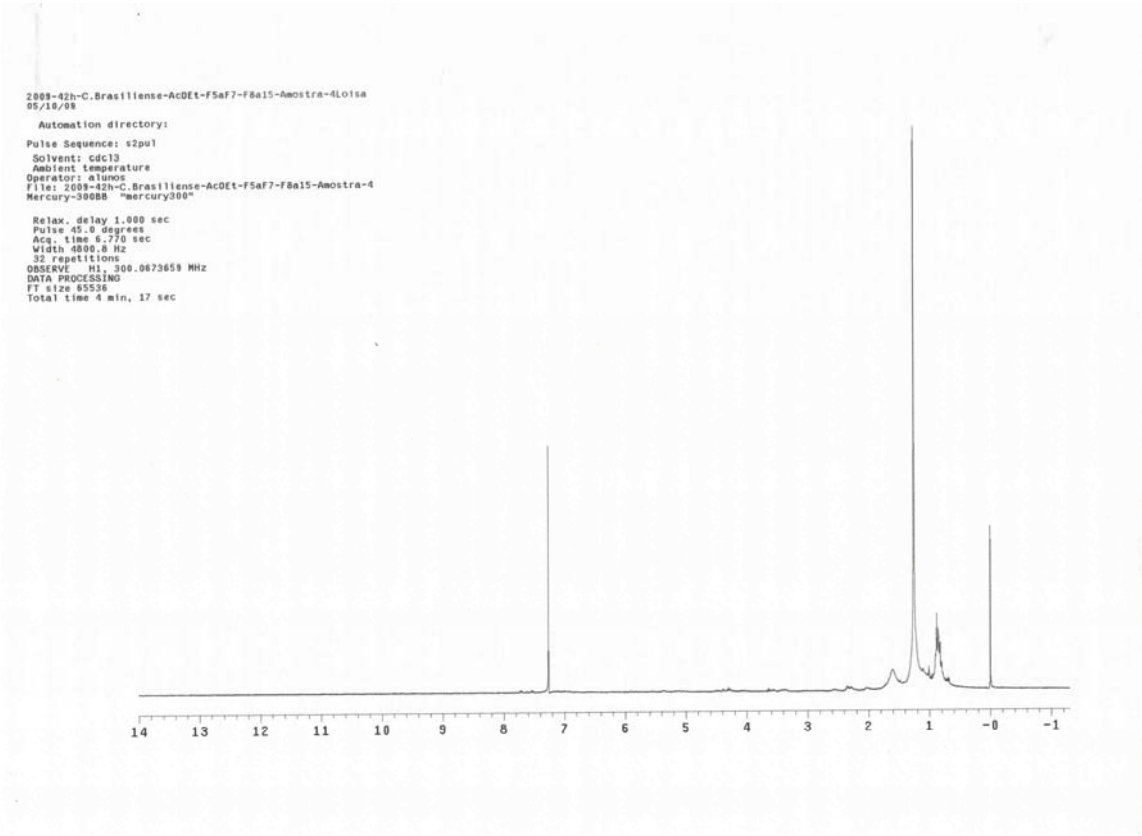
RMN ^{1}H da subfração 1 da amostra 2



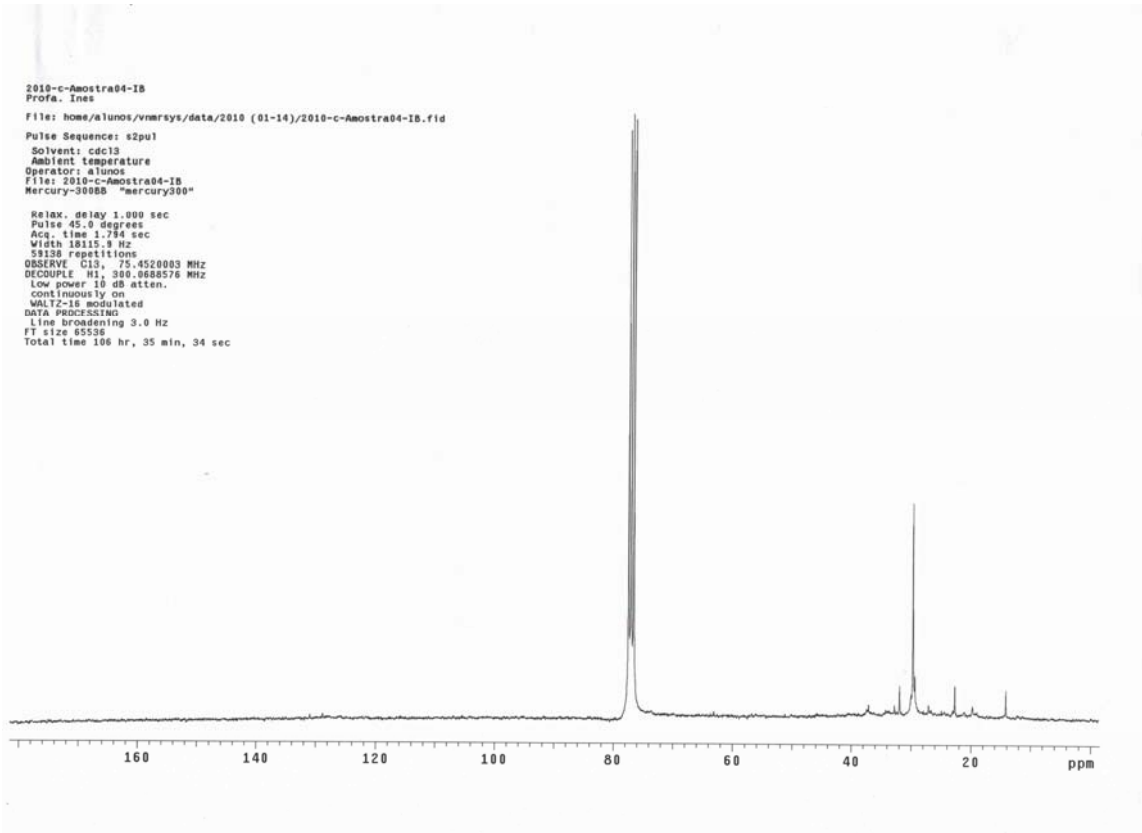
RMN ^{13}C da subfração 1 da amostra 2



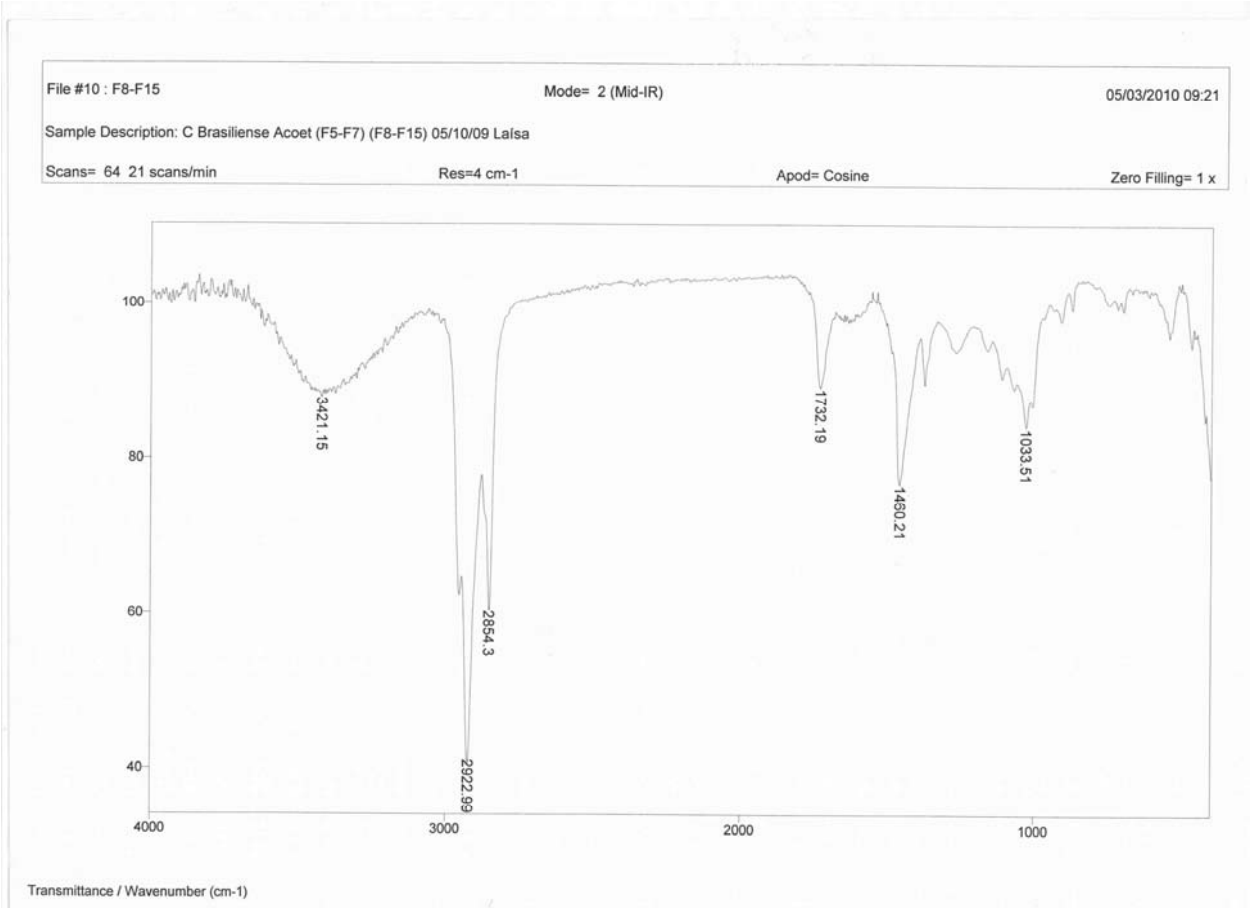
Infravermelho da subfração 1 da amostra 2



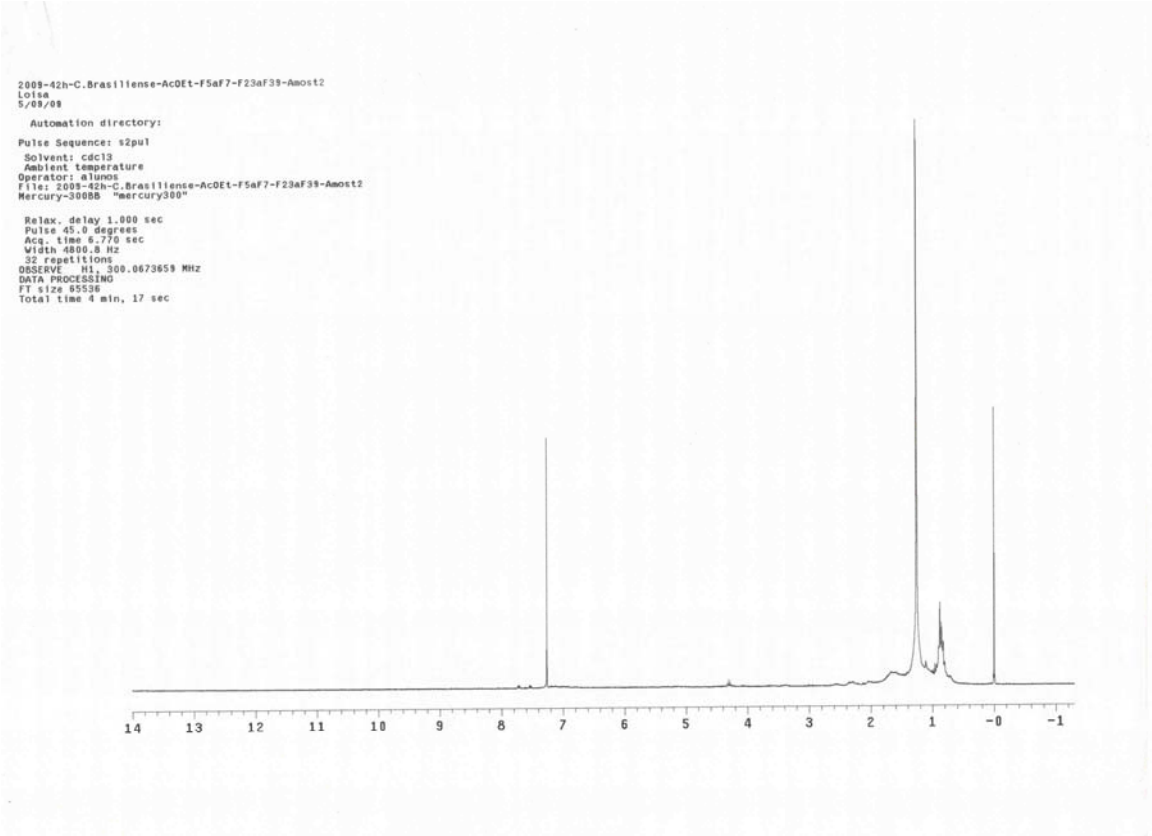
RMN ^{1}H da subfração 2 da amostra 2



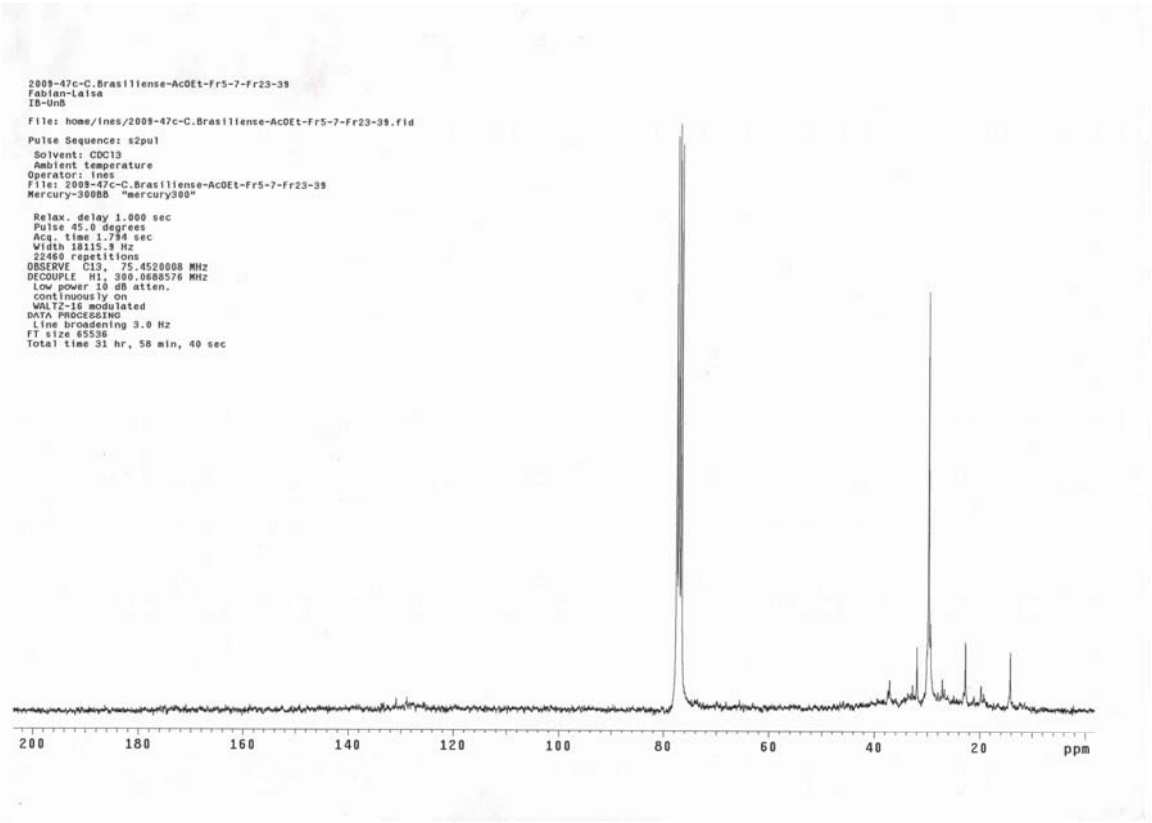
RMN ^{13}C da subfração 2 da amostra 2



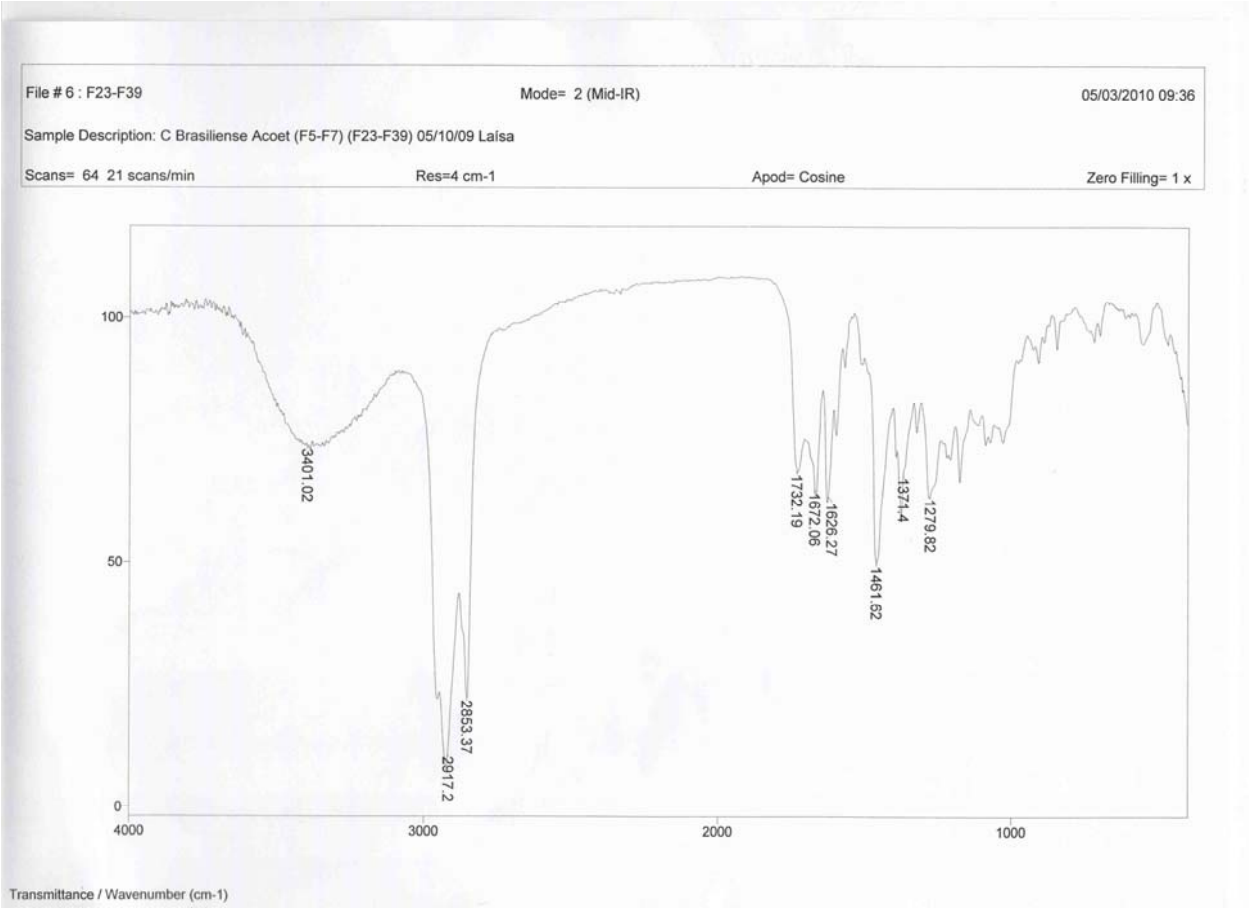
Infravermelho da subfração 2 da amostra 2



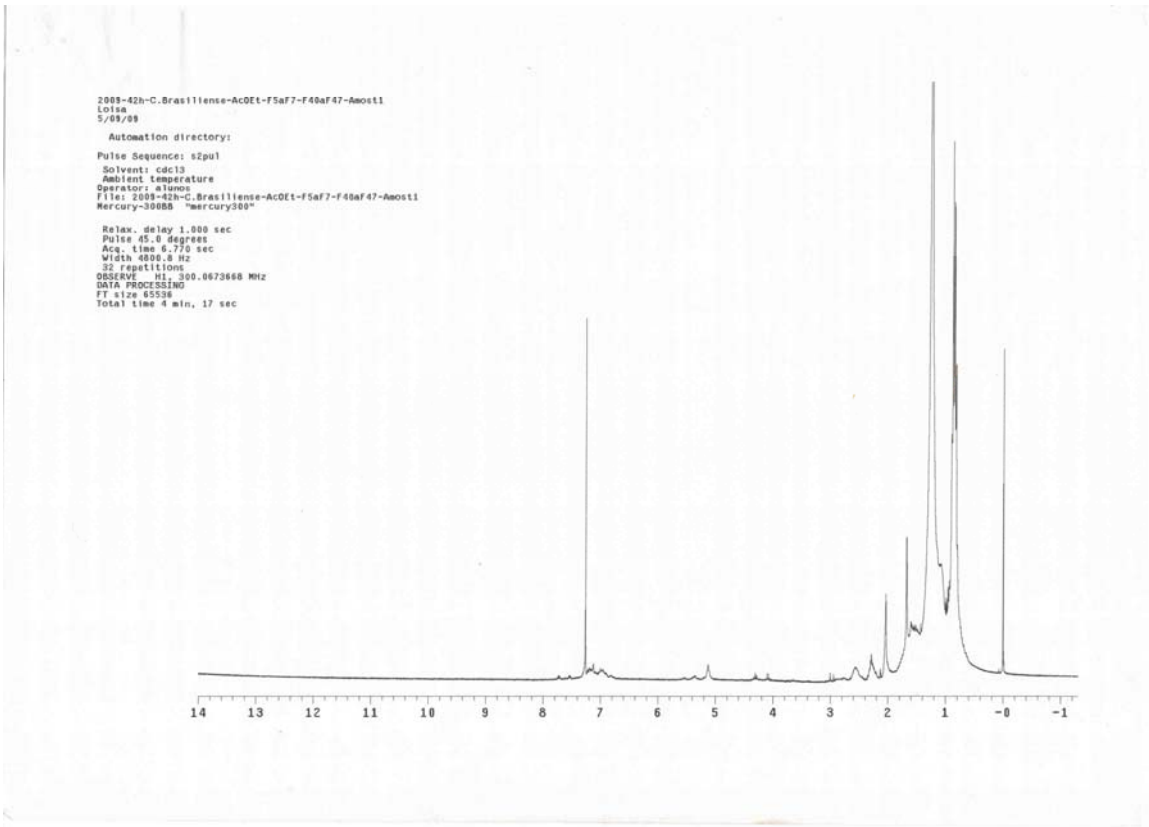
RMN ^{1}H da subfração 3 da amostra 2



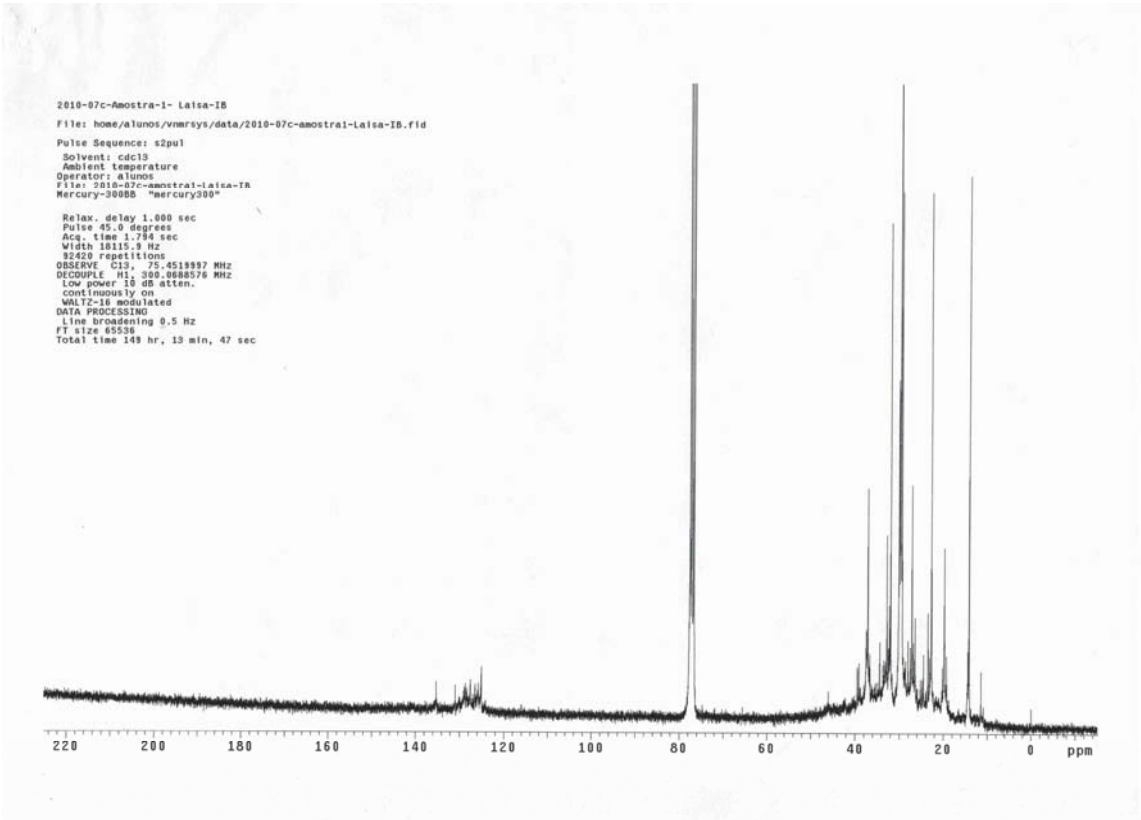
RMN ^{13}C da subfração 3 da amostra 2



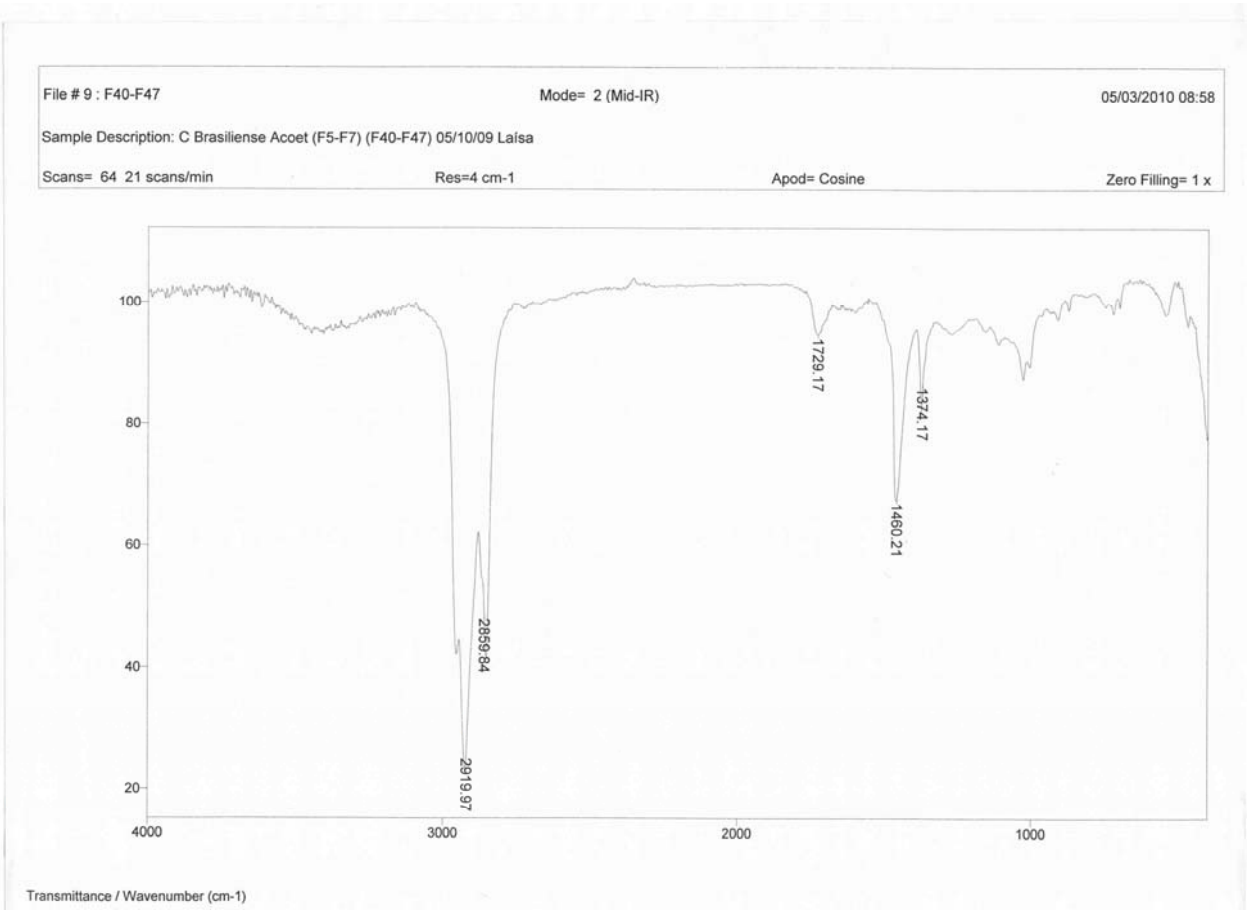
Infravermelho da subfração 3 da amostra 2



RMN ^{1}H da subfração 4 da amostra 2



RMN ^{13}C da subfração 4 da amostra 2



Infravermelho da subfração 4 da amostra 2

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo