



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Programa de Pós Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



MAYARA GOBETTI FERNANDES DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE RAÍZES
DE CAPIM ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)
E ESTUDO FITOQUÍMICO

DISSERTAÇÃO

Pato Branco

2014

MAYARA GOBETTI FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE RAÍZES
DE CAPIM ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)
E ESTUDO FITOQUÍMICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – PPGTP, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – câmpus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” – Área do conhecimento: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias Teixeira.

Coorientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi

Pato Branco

2014

S586a Silva, Mayara Gobetti Fernandes da.
Avaliação do potencial alelopático de raízes de capimannoni-2
(*Eragrostis plana* Nees) e estudo fitoquímico / Mayara Gobetti Fernandes
da Silva. -- 2014.
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira
Coorientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2014.
Bibliografia: f. 86 – 94.

1. *Eragrostis plana* Nees. 2. Fitoquímica. 3. Alelopatia. I. Teixeira, Sirlei
Dias, orient. II. Trezzi, Michelangelo Muzzel, coorient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 17

Título da Dissertação

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE RAÍZES DE CAPIM ANNONI-2
(*Eragrostis plana* Nees) E ESTUDO FITOQUÍMICO",**

Autora

MAYARA GOBETTI FERNANDES DA SILVA

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 50 minutos do dia 13 de agosto 2014, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dra. Sirlei Dias Teixeira - UTFPR
Presidente

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima – UTFPR
Examinador

Prof. Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia - UFPR
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof.^a Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Dedico esta dissertação a minha mãe Denize e a minha irmã Suélen, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional que me mostrou a direção correta levando-me as vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

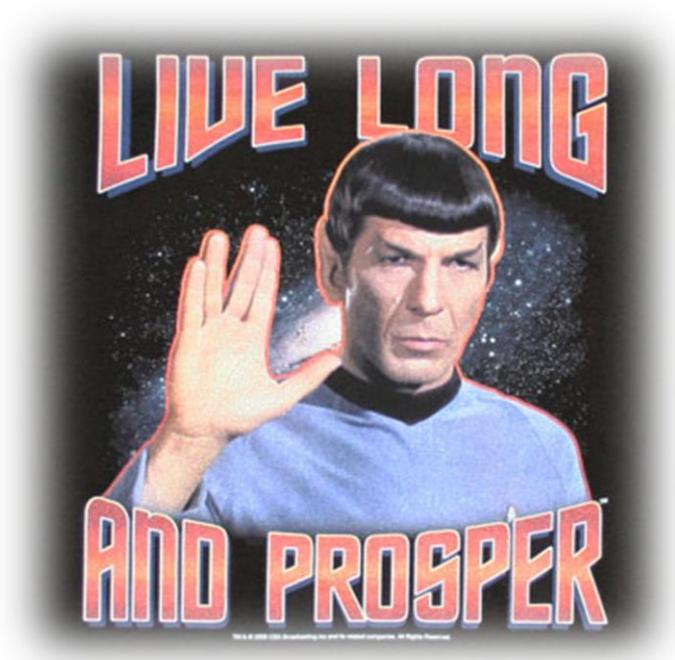
A Deus e a minha família, que se esforçou tanto para que eu tivesse boas condições de estudo, que me apoiaram dando-me forças desde o início e entenderam minha ausência nessa etapa da minha vida.

Agradeço aos amigos e professores que colaboraram direta ou indiretamente na realização desta dissertação, e aos responsáveis pelos laboratórios de Química e Agronomia da UTFPR - câmpus Pato Branco.

A minha orientadora, professora Dr^a. Sirlei Dias Teixeira.

Ao meu coorientador, professor Dr. Michelangelo Muzell Trezzi.

Enfim, a todos que contribuíram para que esta dissertação fosse concluída.



"Spock (Star Trek)"

RESUMO

SILVA, Mayara G. F. da. Avaliação do Potencial Alelopático de Raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e Estudo Fitoquímico. 2014. 99 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

O Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), considerado uma planta daninha invasora e de difícil erradicação, tem a capacidade de dominar o meio em que se encontra, sobrepondo-se a espécies nativas e agroecônômicas. Parte desta capacidade está relacionada a efeitos alelopáticos causados por aleloquímicos liberados por esta espécie. Assim, a identificação desses aleloquímicos pode ser uma boa alternativa para produção de bio-herbicidas. Neste estudo, determinou-se o potencial alelopático de extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol provenientes da raiz de *E. plana* Nees coletadas no verão na área experimental do curso de Agronomia da UTFPR - câmpus Pato Branco, como também um estudo fitoquímico para elucidação estrutural de possíveis aleloquímicos. O potencial alelopático foi avaliado a partir de bioensaios de germinação e crescimento de radícula e hipocótilo, utilizando-se duas espécies receptoras (*Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*) e três concentrações dos extratos brutos (200, 400 e 600 ppm). Como resultados observou-se que os extratos brutos de éter de petróleo e acetato de etila atuam principalmente na cinética do processo de germinação, retardando-o, enquanto que o extrato bruto de metanol atuou, sobretudo na diminuição da germinação, inibindo 75,4% em comparação com o branco (água destilada), causando até deformidades e mortes de plântulas, estes dados para a espécie receptora *E. heterophylla*, a mais afetada. Quanto ao bioensaio de crescimento de hipocótilo e radícula, o extrato bruto de metanol foi o menos eficaz, destacando-se o extrato bruto de éter de petróleo a 600 ppm contra a espécie receptora *I. grandifolia*, causando uma diminuição no crescimento da radícula e hipocótilo de 66,3% e 65,5%, respectivamente, e o extrato bruto de acetato de etila também a 600 ppm contra a espécie receptora *E. heterophylla*, causou uma diminuição de 63,6% e 72% do comprimento do hipocótilo e radícula, respectivamente, ambos em comparação com seus respectivos brancos (água destilada). Através do estudo fitoquímico foi proposta a estrutura de um diterpeno, por meio do fracionamento e purificação do extrato bruto de éter de petróleo, e um composto, cuja estrutura não foi ainda completamente elucidada, este a partir do extrato bruto de metanol. Os efeitos alelopáticos apresentados pelas raízes do Capim Annoni-2, foram bastante efetivos, podendo estes serem atribuídos as substâncias fitotóxicas isoladas nesse estudo.

Palavras-chave: *Eragrostis plana* Nees; fitoquímica; alelopatia.

ABSTRACT

SILVA, Mayara G. F. da. Assessment of allelopathic potential of a Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) Roots and Phytochemical Study. 2014. 99 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

The Grass Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), considered a noxious invasive and difficult to eradicate plant has the capacity to dominate the environment they are in, superseding Agrieconomic and native species. Part of this ability is related to allelopathic effects caused by allelochemicals released by this species. Thus, the identification of these allelochemicals can be a good alternative for the production of bio-herbicides. In this study, we determined the allelopathic potential of crude extracts of petroleum ether, ethyl acetate and methanol from the root of *E. plana* Nees collected in the summer in the experimental area of the course of Agronomy UTFPR - Pato Branco campus, as well as a phytochemical study for structural elucidation of potential allelochemicals. The allelopathic potential was assessed from bioassays of germination and growth of radicle and hypocotyl, using two receptor species (*Ipomoea grandifolia* and *Euphorbia heterophylla*) and three concentrations of crude extracts (200, 400 and 600 ppm). As a result it was found that crude extracts of petroleum ether and ethyl acetate act mainly on the kinetics of the germination process by slowing it, while the crude methanol extract worked, especially in reducing the germination inhibiting 75.4% in comparison with blank (distilled water), causing deformities, and even death of seedlings these data to the recipient *E. heterophylla*, most affected. Regarding the growth bioassay hypocotyl and radicle, crude methanol extract was the least effective, highlighting the crude extract of petroleum ether at 600 ppm against receiving *I. grandifolia* species, causing a decrease in the growth of radicle and hypocotyl 66.3% and 65.5%, respectively, and the crude ethyl acetate extract also receiving 600 ppm against *E. heterophylla* caused a decrease of 63.6% and 72% of the length of the hypocotyl and radicle respectively, both compared with their white (distilled water). Through phytochemical study was proposed structure of a diterpene, through the fractionation and purification of the crude extract of petroleum ether, and a compound whose structure has not been fully elucidated, this from crude methanol extract. The allelopathic effects shown by the roots of the grass Annoni-2, were quite effective, these can be attributed to the isolated phytotoxic substances in this study.

Keywords: *Eragrostis plana* Nees; phytochemical; allelopathy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Meios de atuação dos compostos alelopáticos na fisiologia das plantas.	27
Figura 2 - Formas de liberação dos aleloquímicos.	27
Figura 3 - Ilustração da radícula e do hipocótilo.	29
Figura 4 - Capim Annoni-2 (Área Experimental UTFPR - câmpus Pato Branco - PR).	32
Figura 5 - Fluxograma para obtenção dos extratos.	35
Figura 6 - Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>).	37
Figura 7 - Corda de Viola (<i>Ipomoea grandifolia</i>).	37
Figura 8 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de éter de petróleo.	42
Figura 9 - Substâncias identificadas a partir do extrato bruto de éter de petróleo.	42
Figura 10 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de acetato de etila.	46
Figura 11 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de metanol.	47
Figura 12 - Área de coleta do Capim Annoni-2 - campo experimental do curso de Agronomia da UTFPR - câmpus Pato Branco.	49
Figura 13 - Secagem das raízes de Capim Annoni-2 (<i>E. plana</i> Nees).	50
Figura 14 - Moagem das raízes secas de Capim Annoni-2 (<i>E. plana</i> Nees).	50
Figura 15 - Extrato bruto de metanol sendo rota-evaporado.	50
Figura 16 - (a) Infravermelho, (b) suporte e placas de KBr e (c) Interior do infravermelho com o suporte.	51
Figura 17 - Espectros no infra vermelho dos extratos brutos de éter de petróleo (em preto), acetato de etila (em vermelho) e metanol (em azul).	52
Figura 18 - Dendrograma resultante da análise de HCA, onde RVE, RVA e RVM correspondem respectivamente aos extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol.	54
Figura 19 - Soluções do extrato bruto de metanol, (a) 600 ppm, (b) 400 ppm, (c) 200 ppm e (d) Controle (metanol + Tween).	55
Figura 20 - Teste de Schardakow (método da gota): (a) colocando a gota (10 µL) da solução a ser testada colorida com azul de metileno na solução de glicose (0,001 mol/L), (b) exemplo de uma solução em que a gota subiu	

	resultando em um potencial osmótico menor que 0,026 MPa, (c) exemplo de uma solução em que a gota ficou em equilíbrio com a solução de glicose resultando em um potencial osmótico de 0,026 MPa.	56
Figura 21	- (a) desinfecção das sementes de <i>E. heterophylla</i> , (b) quebra de dormência das sementes de <i>I. grandifolia</i> , (c) e (d) sementes de <i>E. heterophylla</i> e <i>I. grandifolia</i> , respectivamente, secas e prontas para análise de germinação e/ou germinação em caixas tipo Gerbox para análise de crescimento.....	57
Figura 22	- (a) sementes de <i>I. grandifolia</i> postas para germinar em caixas tipo Gerbox e (b) sementes após dois dias de germinação.	57
Figura 23	- Início do teste de germinação, (a) sementes de <i>I. grandifolia</i> e (b) sementes de <i>E. heterophylla</i>	58
Figura 24	- Exemplos: (a) — sementes germinadas e - - - sementes dormentes e (b) semente morta.	58
Figura 25	- Exemplo <i>E. heterophylla</i> : (a) plântula normal, (b) plântula anormal e (c) plântula morta.....	59
Figura 26	- Início do teste de crescimento, (a) sementes pré-germinadas de <i>I. grandifolia</i> e (b) sementes pré-germinadas de <i>E. heterophylla</i>	70
Figura 27	- Exemplos de plântulas mortas: (a) <i>I. grandifolia</i> e (b) <i>E. heterophylla</i> . ..	70
Figura 28	- Exemplos da anomalias ocorridas durante os bioensaios: (a) oxidação (necrose) da radícula, (b) mal desenvolvimento das folhas, (c) oxidação do hipocótilo, (d) oxidação da radícula e hipocótilo e (e) oxidação das folhas.	80
Figura 29	- (a) Fracionamento do extrato de éter de petróleo, (b) e (c) acetato de etila e (d) metanol, (e) frações obtidas do extrato de éter de petróleo, (f) e (g) revelação da CCD por UV no comprimento de onda 254 e 365 nm, respectivamente.	81
Figura 30	- (a) Estrutura da 3,20-di-hidroxi-ent-1(10) 15-rosadieno e (b) Numeração dos carbonos.....	82
Figura 31	- Espectro de RMN de ¹ H da amostra RVE - 2.	84
Figura 32	- Comparação da estrutura proposta para METANOL - 1 com a rotenona.	85

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Gráfico resultante da análise de PCA, onde Fator 1 e 2 correspondem respectivamente a PC1 e PC2, e RVE, RVA e RVM aos extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol respectivamente.53
- Gráfico 2** - Porcentagem de Germinação (PG) avaliando a interação Espécie vs. Extrato. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.64
- Gráfico 3** - Porcentagem de Germinação (PG) avaliando a interação Espécie vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.65
- Gráfico 4** - Tempo Médio de Germinação (TMG) avaliando a interação Extrato vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.66
- Gráfico 5** - Velocidade Média de Germinação (VMG) avaliando a interação Extrato vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.67
- Gráfico 6** - Porcentagem de Plântulas Normais (PPN) avaliando a interação Espécie vs. Extrato. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.68
- Gráfico 7** - Porcentagem de Plântulas Normais (PPN) avaliando a interação Espécie vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.68
- Gráfico 8** - Comprimento da Radícula (mm) avaliando a Interação Extrato vs. Concentração para a *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.74

- Gráfico 9** - Comprimento do Hipocótilo (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.75
- Gráfico 10** - Variável PM (%) a nível de concentração para *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.76
- Gráfico 11** - Comprimento da Radícula (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.77
- Gráfico 12** - Comprimento do Hipocótilo (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.78
- Gráfico 13** - Variável PM (%) a nível de concentração para *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais grupos orgânicos com potencial alelopático.....	23
Tabela 2 - Rendimento dos extratos brutos.	51
Tabela 3 - Resumo da ANOVA para as variáveis tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e porcentagem de germinação (PG), plântulas normais (PPN) e sementes dormentes (PSD).	63
Tabela 4 - Resumo da ANOVA para as variáveis Comprimento de Radícula, Hipocótilo e Porcentagem de Plântulas Mortas (PM) para o 8 ^o dia do bioensaio em <i>I. grandifolia</i>	73
Tabela 5 - Resumo da ANOVA para as variáveis Comprimento de Radícula, Hipocótilo e Porcentagem de Plântulas Mortas (PM) para o 8 ^o dia do bioensaio em <i>E. heterophylla</i>	73
Tabela 6 - Comparação das absorções experimentais com dados da literatura	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fluxogramas das frações purificadas do extrato bruto de éter de petróleo.	43
Quadro 2 - Fluxogramas das frações purificadas do extrato bruto de acetato de etila.	46
Quadro 3 - Fluxogramas das frações purificadas do extrato bruto de metanol.	48
Quadro 4 - Resultados do bioensaio de germinação para a espécie receptora <i>I. grandifolia</i>	59
Quadro 5 - Resultados do bioensaio de germinação para a espécie receptora <i>E. Heterophylla</i>	60
Quadro 6 - Resultados das variáveis TMG, VMG e PG para a espécie receptora <i>I. grandifolia</i>	61
Quadro 7 - Resultados das variáveis TMG, VMG e PG para a espécie receptora <i>E. heterophylla</i>	62
Quadro 8 - Resultados do 8º dia de experimento das variáveis Comprimento da Radícula, Comprimento do Hipocótilo e Plântulas Mortas (PM%) para a espécie receptora <i>I. grandifolia</i>	71
Quadro 9 - Resultados do 8º dia de experimento das variáveis Comprimento da Radícula, Comprimento do Hipocótilo e Plântulas Mortas (PM%) para a espécie receptora <i>E. heterophylla</i>	72

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

PCA	Análise de Componentes Principais
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
TMG	Tempo Médio de Germinação
VMG	Velocidade Média de Germinação
PG	Porcentagem de Germinação
PSD	Porcentagem de Sementes Dormentes
PSM	Porcentagem de Sementes Mortas
PPN	Porcentagem de Plântulas Normais
PPA	Porcentagem de Plântulas Anormais
PM	Porcentagem de Plântulas Mortas
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
R _f	Tempo de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
UV	Ultravioleta
PPM	Partes Por Milhão
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 POTENCIAL ALELOPÁTICO	21
3.2 COMPOSTOS COM EFEITO ALELOPÁTICO	22
3.3 BIOENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO	28
3.4 POTENCIAL ALELOPÁTICO E PLANTAS DANINHAS.....	29
3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO	30
3.6 CAPIM ANNONI-2 (<i>Eragrostis plana</i> Nees).....	31
4 MÉTODOS	34
4.1 COLETA DO CAPIM ANNONI-2 (<i>Eragrostis plana</i> Nees)	34
4.2 PREPARO DA AMOSTRA	34
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	34
4.4 POTENCIAL OSMÓTICO PELO MÉTODO DE SCHARDAKOW	36
4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS	36
4.5.1 Espécies Receptoras	37
4.5.2 Bioensaio de Germinação de Sementes	38
4.5.3 Bioensaio de Crescimento de Radícula e Hipocótilo	39
4.5.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	40
4.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS	40
4.6.1 Fracionamento do Extrato de Éter de Petróleo.....	41
4.6.2 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila	45

4.6.3 Fracionamento do Extrato de Metanol.....	47
4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 COLETA E PREPARO DA RAÍZ DE CAPIM ANNONI-2 (<i>Eragrostis plana</i> Nees)	49
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	50
5.3 INFRAVERMELHO	51
5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS	55
5.4.1 Preparo das Soluções e Determinação do Potencial Osmótico	55
5.4.2 Espécies Receptoras (Pré-análise)	56
5.4.3 Bioensaio de Germinação	57
5.4.4 Bioensaio de Crescimento de Radícula e Hipocótilo	70
5.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATOS BRUTOS.....	81
5.5.1 Substâncias Identificadas do Extrato Bruto de Éter de Petróleo	81
5.5.4 Estrutura Proposta para Substância Isolada do Extrato de Metanol	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

A alelopatia pode ser entendida como a influência que uma planta causa sobre outra, seja esta influência nociva ou benéfica, esta ciência diz que o efeito alelopático é ocasionado por substâncias químicas denominadas aleloquímicos, que são produzidos por uma determinada espécie de planta e disseminados no ambiente (ALVES et al., 2004). Esses compostos orgânicos, devido ao seu potencial alelopático, têm sido empregados como uma opção em substituição aos herbicidas sintéticos. Os aleloquímicos provêm do metabolismo das plantas, durante o desenvolvimento destas, esses compostos oferecem alguns benefícios, como ação contra micro-organismos, vírus, insetos, patógenos ou predadores e inibição ou estimulação no crescimento ou desenvolvimento de outras plantas (WALLER, 1999).

A evolução na química de produtos naturais, através de técnicas de extração, isolamento, purificação e identificação de compostos, têm contribuído para o conhecimento de vários metabólitos, sendo diversos destes potenciais aleloquímicos.

Algumas espécies daninhas situadas nos agroecossistemas podem ter um efeito alelopático sobre os sistemas de plantio liberando os aleloquímicos pelas folhas, raízes ou resíduos vegetais. O Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma espécie daninha nativa da África do Sul, que apresenta um rápido desenvolvimento e é considerada uma planta infestante, com tendência a dominar o espaço em que se localiza formando verdadeiras colônias puras (BARBOSA et al., 2012).

Desta forma, possivelmente estas características podem estar relacionadas ao potencial alelopático desta espécie. Este trabalho justifica-se em função da possibilidade de realização de um estudo sob o aspecto químico das propriedades alelopáticas do Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), por meio dos extratos brutos (obtenção e testes) e da possível identificação de substâncias químicas com atividade alelopática e conseqüentemente ação herbicida, uma vez que, os relatos encontrados na literatura tratam do potencial alelopático dessa planta apenas sob o ponto de vista biológico e ou agrônômico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Examinar as propriedades alelopáticas do Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) a partir do estudo fitoquímico das raízes dessa planta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos brutos das raízes de capim annoni-2 utilizando os solventes éter de petróleo, acetato de etila e metanol;
- Utilizar análises no infravermelho, para observação de semelhanças e diferenças dos extratos brutos obtidos;
- Avaliar o potencial alelopático dos extratos brutos contra duas espécies receptoras (leiteira (*Euphorbia heterophylla*) e corda de viola (*Ipomoea grandifolia*));
- Isolar e identificar, por meio de técnicas cromatográfica e espectrométricas, o(s) metabólito(s) secundário(s) fixo(s), obtido(s) do(s) extrato(s) bruto(s), realizando-se um estudo fitoquímico;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 POTENCIAL ALELOPÁTICO

De origem grega, o termo alelopatia foi definido como a ligação das palavras gregas *alléton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) (FERNANDES; MIRANDA; SANQUETTA, 2007; MOLISCH, 1937). Faz parte de uma cadeia de comunicação química entre os organismos, colaborando para a defesa das plantas (VIDAL, 2010; TREZZI, 2002).

A alelopatia é definida como uma influência positiva ou negativa de metabólitos secundários produzidos por uma planta e difundidos no meio em que esta se encontra (SOUZA et al., 2007; FERREIRA; AQUILA, 2000).

O fenômeno da alelopatia ilustra, no campo ecológico, os mecanismos de sucessão vegetal, onde plantas invasoras são capazes de excluir plantas nativas a partir de resíduos e compostos químicos liberados para o meio ambiente. Podendo intervir em populações vegetais, tanto em áreas agrícolas, quanto naturais (ALMEIDA, 2006; HEISEY; HEISEY, 2003).

Primeiramente, os estudos sobre alelopatia eram realizados somente nos países da América do Norte e Europa. Contudo, nos últimos 70 anos, esta ciência se difundiu pelo mundo, sendo atualmente praticada em países da Ásia, América do Sul e Oriente Médio (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

Os compostos alelopáticos constituem diversos grupos de compostos secundários, e os progressos na química de produtos naturais, colaboram para a identificação destes compostos, podendo estes serem estudados através dos extratos orgânicos ou aquosos provenientes das plantas (COELHO et al., 2011; CHON; KIN, 2002).

Um dos métodos mais empregados para se analisar o potencial alelopático está associado a preparação de extratos de folhas e raízes de plantas, onde se analisa a influência destes extratos na germinação e crescimento de plantas receptoras. Sendo em seguida isolados e identificados os compostos que provocam este potencial alelopático, a fim de se conhecer a composição dos extratos e associar seus efeitos com as substâncias isoladas (ALMEIDA, 2006; SISODIA; SIDDIQUI, 2010).

A identificação do potencial alelopático de plantas adquire papel importante no aspecto ecológico, sobretudo em relação à possibilidade de controlar espécies daninhas e/ou invasoras, uma das principais dificuldades no desenvolvimento de atividades agrícolas (SOUZA FILHO et al., 2009; HIERRO; CALLAWAY, 2003).

3.2 COMPOSTOS COM EFEITO ALELOPÁTICO

As substâncias alelopáticas produzidas pelas plantas são denominadas aleloquímicos, compostos aleloquímicos ou, ainda, fitotoxinas (OLIVEIRA et al., 2011). Estes compostos químicos podem influenciar, por exemplo, na vegetação de um local, na sucessão de plantas, na germinação de sementes, na produtividade de culturas, dentre outros (DEMUNER et al., 2005).

A evolução na química de produtos naturais, através de metodologias modernas de extração, isolamento, purificação e identificação, têm colaborado para o conhecimento de numerosos compostos secundários. Sendo muitos destes compostos com potenciais alelopáticos (FERREIRA; AQUILA, 2000; CHON; NELSON, 2010).

Estas substâncias são sinais químicos transmitidos ao meio ambiente, comumente em pouca quantidade, sendo responsáveis pelas influências químicas positivas ou negativas entre diversas espécies de plantas (ALMEIDA, 2006). O tempo de residência e a persistência destas no solo podem aumentar, diminuir ou fazer cessar o seu efeito alelopático. Inclusive, o próprio andamento diário do metabolismo primário, que variam nas diferentes horas do dia, tem repercussões no metabolismo secundário (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Cada espécie de planta tem a capacidade de produzir um grupo distinto de substâncias alelopáticas, com atuação sobre os membros do ambiente em que está inserida (INOUE et al., 2010). A quantidade de substâncias produzidas e sua composição variam de acordo com cada espécie de planta e das condições do meio em que esta está inserida, como: temperatura, nutrientes, umidade, incidência de luz, insetos, doenças e defensivos agrícolas (SILVA; SILVA, 2007). Desta forma, essas condições extremas frequentemente aumentam a produção de metabólitos

secundários, conseqüentemente aumentando a atividade alelopática da planta (GOLDFARB; PIMENTEL; PIMENTEL, 2009).

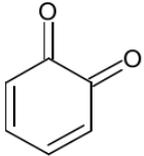
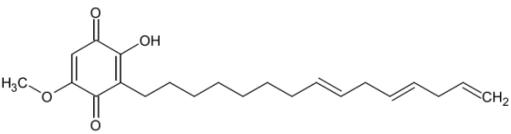
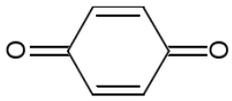
Todas as espécies de plantas são aptas em produzir compostos alelopáticos, sendo que estes são encontrados nas raízes, frutos, folhas, flores, sementes e caules, e sua distribuição nas diversas partes das plantas é variável (SILVA; SILVA, 2007). A localização dos compostos alelopáticos nas plantas está relacionada com a facilidade de liberação destes para o meio ambiente, ou seja, o que pode tornar seus efeitos mais rápidos (SOUZA FILHO; TREZZI; INOUE, 2011).

A ação dos compostos alelopáticos pode ser analisada como ação direta e indireta. A ação indireta inclui a alteração das características do solo, como nutrientes e população e/ou atividade dos micro-organismos. Já a ação direta acontece quando os compostos alelopáticos unem-se às membranas da planta receptora ou entram nas células, intervindo no seu metabolismo (FERREIRA; AQUILA, 2000; KATO-NOGUCHI, 2003).

Na maioria das ocasiões, os compostos alelopáticos são seletivos em suas atuações e as diferentes espécies de plantas também apresentam de certa forma uma seletividade em suas respostas (OLIVEIRA et al., 2011). Os efeitos dos aleloquímicos estão sujeitos a sua concentração e quantidade disponível para absorção (SILVA; SILVA, 2007). Em meio aos principais grupos com potencial alelopático, destacam-se as benzoquinonas, cumarinas, flavonoides, terpenoides, glicosídeos, ácidos fenólicos, alcaloides, rotenoides, catequinas e taninos (Tabela 1) (VYVYAN, 2002; WANG et al., 2010).

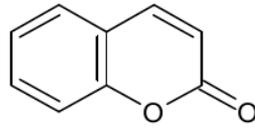
Tabela 1 - Principais grupos orgânicos com potencial alelopático.

(continua)

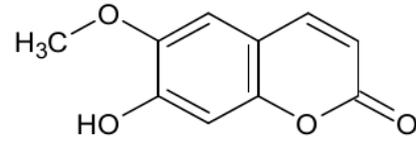
Grupo	Estrutura Básica	Exemplo
Benzoquinonas	 <p><i>o</i>-Benzoquinona</p>	 <p><i>Sorgoleone</i> - aleloquímico exsudado das raízes do sorgo.</p>
	 <p><i>p</i>-benzoquinona</p>	

(continua)

Cumarinas

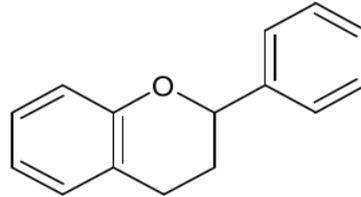


1,2-Benzopirona

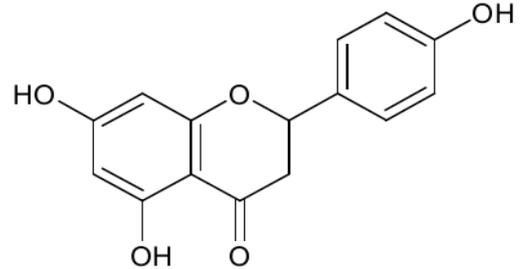


Escopoletina - inibe a germinação de sementes e crescimento de várias plantas.

Flavonoides

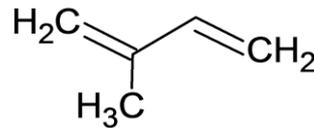


Núcleo Flavânico

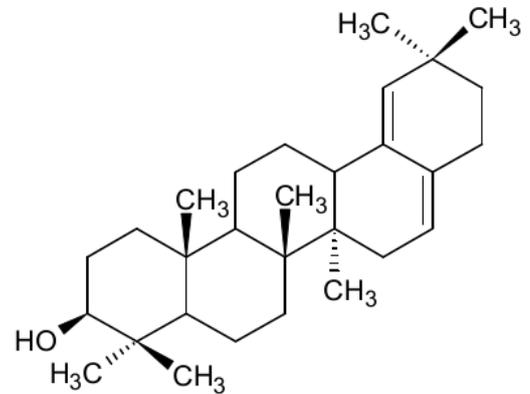


Naringenina - Aleloquímico
Isolado do calopogônio.

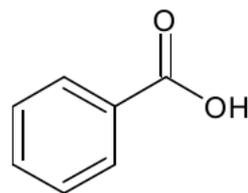
Terpenoides



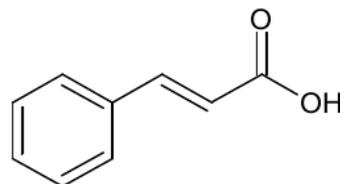
IPP, DMAPP



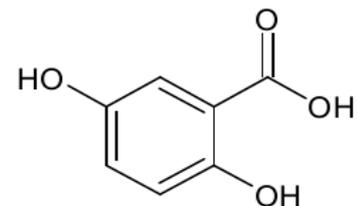
Acacidol - Aleloquímico isolado da acácia.

Ácidos
Fenólicos

Derivados do ácido benzóico



Derivados do ácido cinâmico



Ácido Gentísico - Aleloquímico
Isolado do eucalipto.

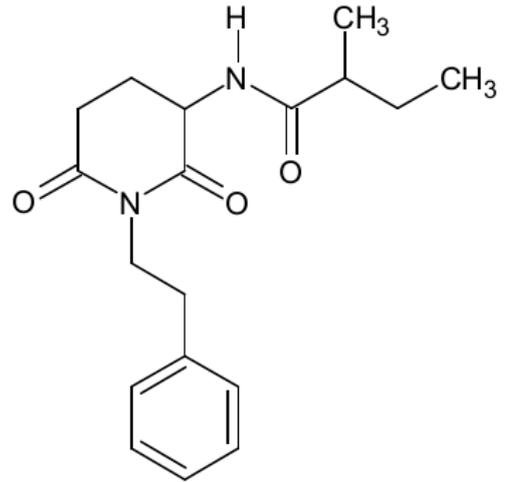
*Sendo em ambos os casos uma das substituições no anel, uma hidroxila

(continua)

Alcaloides

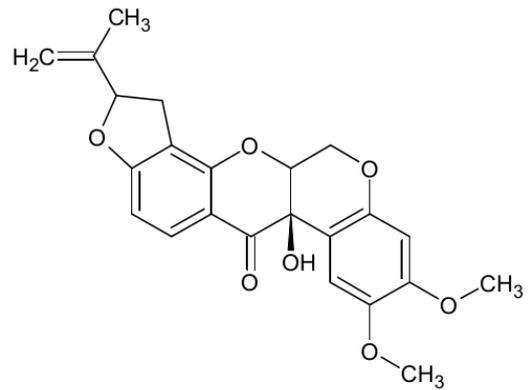
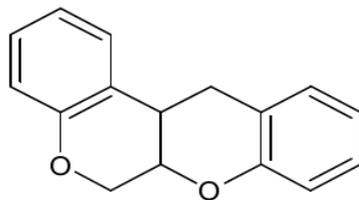


Grupo heterogêneo de difícil definição.



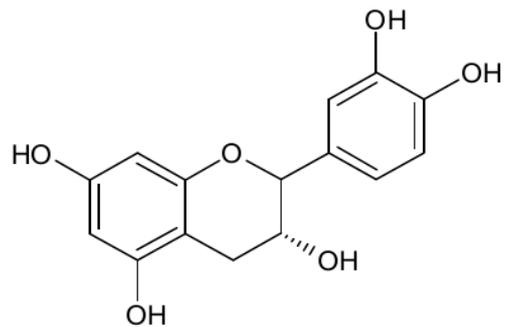
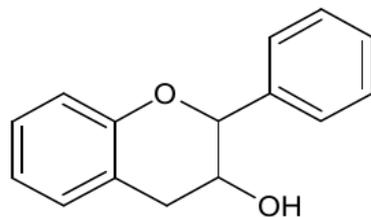
Julocrotina - Aleloquímico isolado do cróton.

Rotenoides



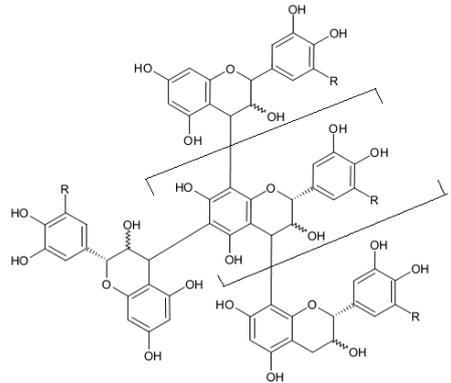
12a-hidroxi-rotenona - Aleloquímico isolado da raiz do anil-bravo.

Catequinas



Epicatequina - Aleloquímico isolado do Tachi preto

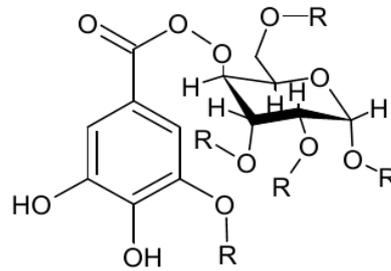
(conclusão)



Taninos

Taninos condensados

Esta classe é identificada nas plantas com potencial alelopático através de ensaios clássicos laboratoriais específicos.



Taninos gálicos

Fonte: VYVYAN, 2002; OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2009; WANG et al., 2010; MUANGSIN et al., 2011; SOUZA FILHO et al., 2005; ARRUDA et al., 2006; LUZ et al., 2010; CAVALHEIRO et al., 2009; SEBASTIÃO et al., 2010; LÔBO et al., 2008; VITAL et al., 2004.

Estas substâncias atuam diretamente na fisiologia das plantas, especialmente na divisão, alongamento e estrutura celular, além de intervirem no crescimento, permeabilidade da membrana celular, respiração, fotossíntese, síntese lipídica, protéica, e de ácidos graxos (Figura 1) (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008).

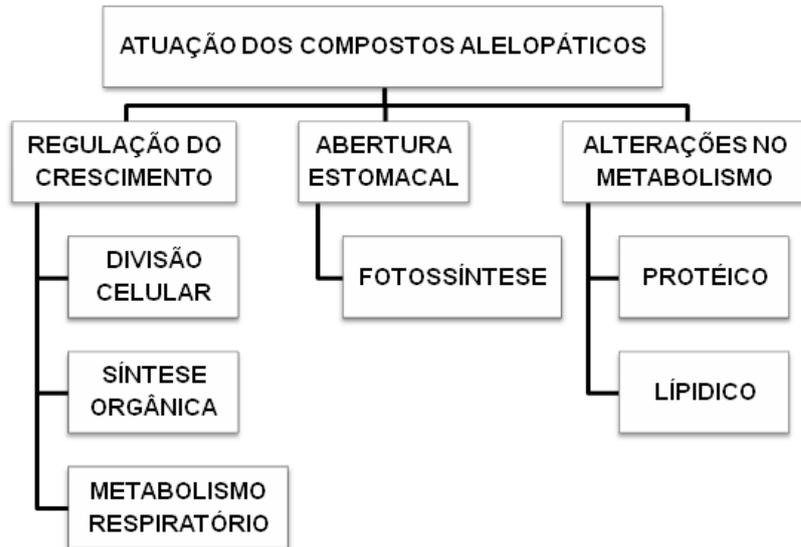


Figura 1 – Meios de atuação dos compostos alelopáticos na fisiologia das plantas.

Fonte: Adaptado de GOLDFARB; PIMENTEL; PIMENTEL, 2009.

Os aleloquímicos são liberados das diferentes partes das plantas para o meio ambiente de diversas maneiras, como exsudação radicular, decomposição de resíduos vegetais, volatilização, e lixiviação (figura 2) (ZHANG; PAN; LI, 2010).

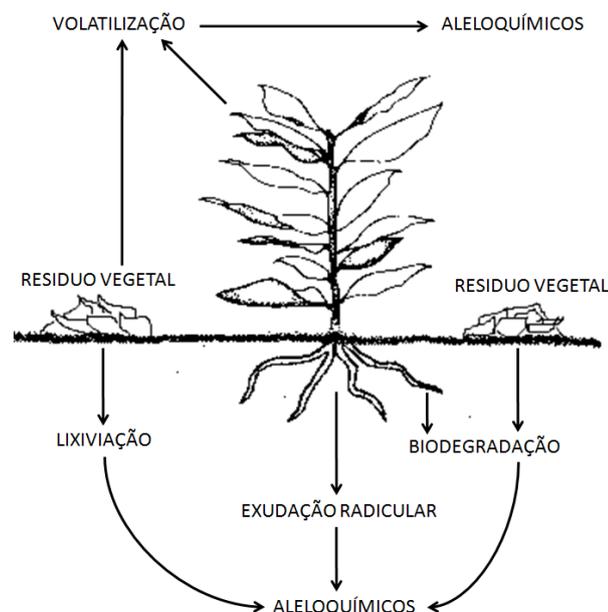


Figura 2 – Formas de liberação dos aleloquímicos.

O percentual de liberação dos aleloquímicos depende da concentração destes nos tecidos da planta e das condições ambientais do meio em que esta está inserida (TREZZI, 2002).

3.3 BIOENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO

Existem várias metodologias que podem ser utilizadas na identificação da atividade alelopática e, muitas destas são fundamentadas na obtenção de extratos brutos de diferentes espécies de plantas, e podem ser obtidos empregando múltiplos solventes, com polaridades distintas, como hexano, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol (VIDAL, 2010).

Em estudos iniciais, quando não há conhecimentos prévios sobre a espécie que se deseja estudar, o ideal é que se preparem dois extratos brutos: um com solvente de baixa polaridade e outro com solvente de alta polaridade, ambos utilizando extração exaustiva. Este método permitirá um resultado mais real do potencial da planta em estudo como fornecedora de aleloquímicos (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

Na escolha de plantas receptoras para os bioensaios, o ideal é que elas respondam aos testes alelopáticos de modo mais próximo possível da condição real do meio ambiente (DA SILVA, 2009). Observa-se ainda um melhor resultado com o uso de duas ou mais plantas receptoras, pois, permite um melhor dimensionamento do potencial alelopático da planta doadora, bem como uma condição mais adjacente da realidade do ambiente. Dentre as diversas plantas receptoras a mais utilizada é a alface (*Lactuca sativa*) (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

Em meio as diferentes metodologias empregadas na identificação da atividade alelopática das plantas, destacam-se duas, a de germinação de sementes e a de desenvolvimento de radícula e hipocótilo.

O teste alelopático de germinação de sementes utiliza semeadura em placas de Petri, tendo a capacidade de analisar os efeitos sobre a germinação total, como também, o índice de velocidade de germinação. Este teste é realizado em câmaras de germinação, em condições controladas de temperatura e luz, e em tempo variável, de 7 a 10 dias. Em alguns estudos, contam-se as sementes germinadas ao término do tempo de incubação e calculam-se os resultados; em outros estudos, a contagem é diária, onde as sementes germinadas são/ou não abolidas (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). Nesses processos, considera-se germinadas, as sementes cuja expansão radicular seja igual ou superior a 2 milímetros (TREZZI, 2002; JUNTILA, 1976).

O bioensaio de desenvolvimento de radícula e hipocótilo (Figura 3), abrange a incubação de sementes pré-germinadas em placas de Petri ou caixas gerbox, normalmente com dois dias de germinação, por um tempo de 7 a 10 dias, onde, ao final deste tempo ou em todos os dias, mede-se o extensão da radícula e do hipocótilo da planta receptora do composto alelopático (ALVES et al., 2004).

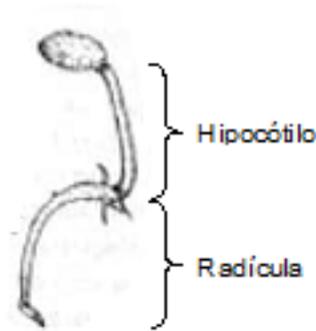


Figura 3 – Ilustração da radícula e do hipocótilo.

Fonte: ANDRADE, et al., 2000 (com modificações).

O hipocótilo e a radícula (Figura 3) são gerados a partir do eixo embrionário da semente, que contém tecidos nos seus dois extremos, oferecendo condições de desenvolvimento nos dois sentidos, além das condições de fixação ao solo e de fotossintetizar os compostos indispensáveis para o seu crescimento (SASAKI, 2008).

3.4 POTENCIAL ALELOPÁTICO E PLANTAS DANINHAS

O grupo de espécies que infestam áreas agrícolas, pecuárias e outros campos de importância para os humanos, e que tomam vários lugares por qualquer motivo, é denominado como uma planta daninha (PITELLI, 1987). As espécies daninhas são difundidas através de vários fatores, como animais, vento, água e pelo próprio homem. Normalmente, estas espécies produzem uma enorme quantidade de sementes, o que garante uma infestação acelerada (SILVA; SILVA, 2007).

Uma espécie pode ser daninha em determinada ocasião, se estiver intervindo negativamente, contudo pode ser favorável em outras circunstâncias como controle de erosão, reciclagem de nutrientes ou ainda, como capacidade medicinal (SILVA; SILVA, 2007).

O fato das espécies daninhas conseguirem sucesso, em relação às espécies cultivadas, acontece por terem uma maior agressividade e habilidade de se adequarem aos fatores do meio ambiente, proporcionando, em amplas culturas, a diminuição na produção, pois, elas concorrem pelos recursos presentes no solo, como nutrientes, água e luz, liberando, assim, substâncias alelopáticas, para dominar o ambiente em que se encontram (INOUE et al., 2010).

A alelopatia vem sendo adotada como um importante mecanismo ecológico, influenciando a vegetação existente em um ecossistema, a sucessão das espécies, e o manejo e produção de culturas agrícolas (OLIVEIRA, et al., 2011).

Diversas espécies daninhas têm potencial alelopático, tendo capacidade para colaborar no controle de outras espécies daninhas por meio do uso de compostos alelopáticos obtidos destas como herbicidas, sendo este um procedimento seguro e eficaz, uma vez que estes produtos são formulados a partir de compostos naturais biodegradáveis e não permanecem no meio como poluente (OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN, 2001).

O crescente desejo de substituir os produtos químicos sintéticos utilizados na agricultura por produtos naturais é o que motiva as pesquisas acerca da alelopatia. Esta ciência pode ser empregada para aprimorar a sustentabilidade dos agroecossistemas e manter a vegetação nativa, pois representam uma opção biológica com ação específica e com mínimo dano ao ambiente (OLIVEIRA, et al., 2011).

A utilização indiscriminada de herbicidas sintéticos tem provocado o desenvolvimento de plantas resistentes a estes, o que conduz a uma demanda de novas substâncias químicas cujos mecanismos e ações sejam diferentes dos ainda empregados (OLIVEIRA et al., 2011). Assim sendo, os compostos alelopáticos extraídos das diferentes espécies de plantas podem ser usados como bioherbicidas em substituição aos herbicidas sintéticos (OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN, 2001).

3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO

Produtos Naturais incluem, um organismo inteiro (uma planta, um animal, ou um micro-organismo) que não tenha sido submetido a qualquer tipo de tratamento

ou tratamento diferente de um simples processo de preservação (por exemplo, secagem), parte de um organismo (folhas, raízes, galhos, flores de uma planta, órgãos isolados de um animal), um extrato de um organismo, ou de uma parte de um organismo, e compostos puros (por exemplo, alcaloides, cumarinas, flavonoides, glicosídeos, lignanas, esteroides, açúcares, terpenos, etc), isolado a partir de plantas, animais ou micro-organismos (SARKER et al., 2006).

Estratégias para a pesquisa na área de produtos naturais têm evoluído bastante significativamente ao longo das últimas décadas. Com a excelente evolução nas áreas da ciência da separação, técnicas espectroscópicas, além de ensaios *in vitro* e *in vivo*, associado a várias técnicas hífenadas, por exemplo, CG-EM, CL-PDA, CL-EM, CL-FTIR, CL-RMN, CL-RMN-EM, CE-EM, tornaram possível a análise e pré-isolamento do extrato bruto ou frações de diferentes fontes naturais, o isolamento e detecção de diversos produtos naturais, estudos quimiotaxonômicos, controle de qualidade de produtos fitoterápicos, além de estudos metabolômicos (SARKER et al., 2006).

3.6 CAPIM ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)

Essa planta é caracterizada como uma gramínea da família *Poaceae*, exótica, cespitosa (nascem vários troncos da mesma raiz), perene, de difícil erradicação e com elevada habilidade de competição com plantas forrageiras em pastos (CARLOTTO et al., 2010; ZEENI; ZILLER, 2011).

Natural do continente africano, especificamente da África do Sul, o Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) (figura 4), teve sua disseminação acidental no Brasil na década de cinquenta, pelo estado do Rio Grande do Sul (ALFAYA et al., 2002). Sua entrada no estado ocorreu devido à contaminação de sementes de outras plantas forrageiras importadas da África (NACHTIGAL et al., 2009).



Figura 4 – Capim Annoni-2 (Área Experimental UTFPR - câmpus Pato Branco - PR).

Fonte: Talita Dalbosco.

Na década de 70, iniciou-se um estudo sobre a provável característica nutricional desta espécie, bem como, sua utilização como gramínea forrageira em pastagens. No ano de 1979, devido aos resultados pouco promissores, como desprezível propriedade nutricional, baixa aceitação pelos animais, elevada competitividade, resistência à seca e simples disseminação, esta espécie foi considerada uma espécie daninha e invasora, centralizando os esforços em sua erradicação e/ou controle (ALFAYA et al., 2002).

A Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) forma touceiras fortemente enraizadas, tendo capacidade de alcançar, quando florescidas, 110 centímetros de altura, reproduzindo-se vegetativamente pela ampliação lateral dessas touceiras (FOCHT, 2008).

Considerado uma planta daninha hostil e de difícil controle na agricultura, é responsável por infestar quase 20% da vegetação dos campos da região Sul do Brasil, o que equivale a um espaço de 3,1 milhões de hectares, tendo um único indivíduo a capacidade de gerar em torno de 300 mil sementes (GOULART et al., 2009).

Sua expansão para diferentes regiões acontece pela condução dos animais e fluxo de automóveis (acostamentos) (MEDEIROS; FERREIRA, 2011). Esta planta é, hoje em dia, uma espécie invasora em diversas regiões da Ásia, Índia, América do Sul e Estados Unidos (BARBOSA et al, 2012). Sendo que seu domínio restringe-se a controle químico, utilizando herbicidas, e mecânico (NACHTIGAL et al., 2009).

Os efeitos da alelopatia afetam a germinação e/ou desenvolvimento de vegetações naturais, evento que pode estar colaborando para a expansão do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) sobre os campos. Esta planta ativa os mecanismos de crescimento, dificultando a germinação e o crescimento inicial de outras plantas ao redor, dominando assim o lugar ao qual está inserida (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008).

4 MÉTODOS

4.1 COLETA DO CAPIM ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)

As raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) foram coletadas, no verão, na área experimental do curso de Agronomia da UTFPR – câmpus Pato Branco. Sua exsicata está depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências – PPG Botânica, sob o número ICN nº 174417.

4.2 PREPARO DA AMOSTRA

Após a coleta, as raízes do Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) foram secas em estufa de circulação de ar a 35 °C (MARCONI MA033/3I/NET), moídas em moinho de facas (Pulverisette 14/Fritsch) e armazenadas para posteriores análises.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Posterior ao preparo conforme o item 4.2, 164 g de raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) foram pesadas em balança semi-analítica (SHIMADZU UX620H), e em seguida submetidas à extração exaustiva a frio, com solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo, acetato de etila e metanol p. a. (Vetec Química Fina) (Figura 5). Os solventes foram renovados em intervalos de 48 horas, com 3 trocas no total (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

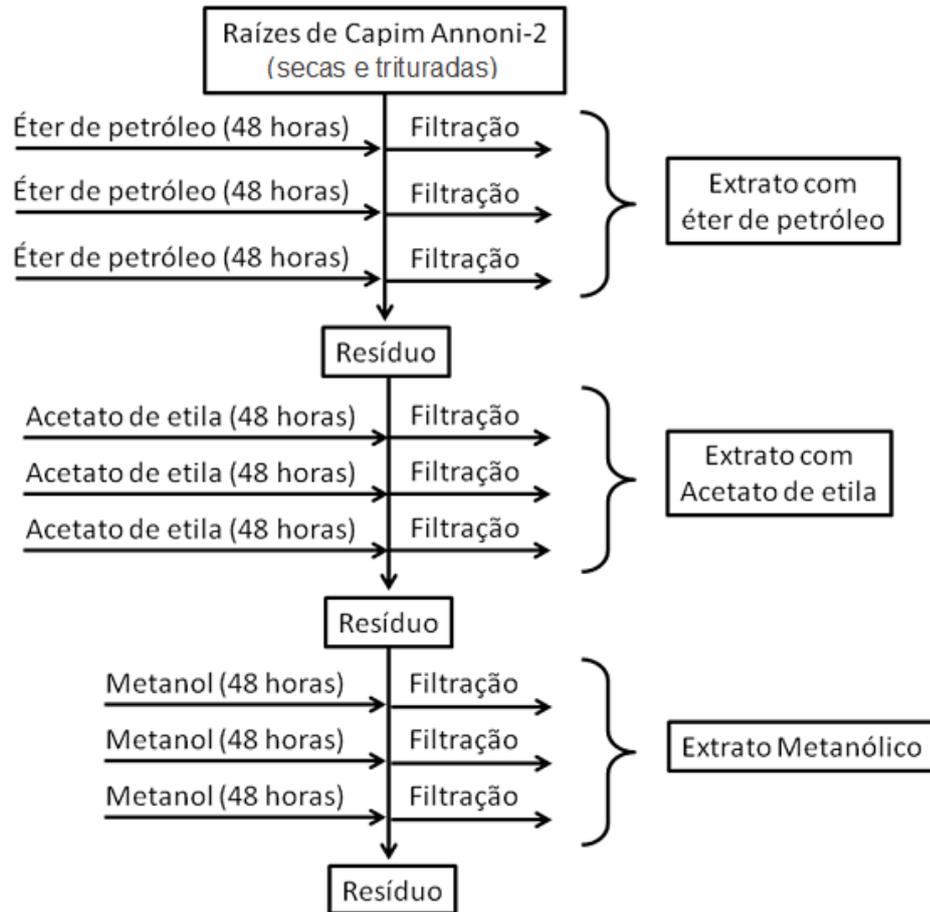


Figura 5 – Fluxograma para obtenção dos extratos.

Após o término da extração exaustiva a frio, os extratos brutos obtidos foram submetidos ao evaporador rotativo (QUIMIS Q344M2), à pressão reduzida e temperatura de 35 °C, para completa remoção do solvente.

Todos os extratos concentrados foram submetidos a análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) em espectrômetro PerkinElmer, analisando a região de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras, realizando duas leituras consecutivas de cada extrato, para posterior análise estatística por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), utilizando o software Pirouette versão 4.0 (Infometrix, Seattle, Washington, USA), para verificar as possíveis diferenças entre os extratos obtidos, devido a diferença de polaridade dos solventes utilizados em cada extração.

Para esta análise, os extratos foram diluídos em diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro, e posteriormente analisados através da formação de um filme entre duas placas de KBr (brometo de potássio).

Para o estudo fitoquímico utilizou-se 1 g de cada extrato bruto, sendo o restante usado no preparo das soluções para a realização dos testes alelopáticos. Nas soluções mais concentradas de 600 ppm foi utilizado uma proporção em massa de extrato e Tween 80 (Vetec Química Fina) de 1:1 (OLIVA, 2006). A partir destas soluções foram realizadas diluições para a obtenção das demais concentrações de 400 e 200 ppm.

4.4 POTENCIAL OSMÓTICO PELO MÉTODO DE SCHARDAKOW

O teste foi realizado com água destilada e soluções de sacarose nas concentrações de 0,01 a 1,00 mol.L⁻¹ (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 e 1,00 mol.L⁻¹). Nas soluções a serem testadas (600, 400 e 200 ppm de cada extrato bruto e controle) foi adicionado azul de metileno para facilitar a visualização da movimentação da gota (10 µL) nas soluções de sacarose, avaliando assim a possível interferência osmótica das soluções a serem testadas (MAESTRI et al., 1998).

4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS

Todos os bioensaios foram realizados em triplicata, utilizando as concentrações de 200, 400 e 600 ppm de cada extrato bruto obtido (éter de petróleo, acetato de etila e metanol). Em cada placa de Petri foi adicionado um volume de 5,0 mL da solução de cada extrato, sendo a partir de então, adicionado apenas água destilada sempre que necessário (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). Em todos os bioensaios foi utilizado água destilada (Branco) e Tween 80, necessário para solubilização dos extratos, acrescido de solvente (Controle), e estes foram realizados nos laboratórios do curso de Agronomia na UTFPR – câmpus Pato Branco.

4.5.1 Espécies Receptoras

As espécies utilizadas foram leiteira (*Euphorbia heterophylla*) (Figura 6) e corda de viola (*Ipomoea grandifolia*) (Figura 7). As sementes foram adquiridas de empresas de produção de sementes e multiplicadas na área experimental do curso de Agronomia da UTFPR – câmpus Pato Branco, passando por processo de limpeza (desinfecção e seleção de sementes) e quebra de dormência quando necessário.



Figura 6 – Leiteira (*Euphorbia heterophylla*).
Fonte: <http://keys.lucidcentral.org>.



Figura 7 – Corda de Viola (*Ipomoea grandifolia*).
Fonte: <https://www.fmcagricola.com.br/>.

No processo de limpeza as sementes das duas espécies receptoras foram desinfetadas com uma solução de álcool etílico 50% por 1 minuto, e em seguida mantidas em contato com uma solução de hipoclorito de sódio/água destilada 3:1 por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente para posterior realização dos testes alelopáticos.

Nas sementes da espécie receptora corda de viola foi necessário realizar, logo após o processo de limpeza, a quebra de dormência através do contato das sementes com água destilada a 98 °C por uma hora, sendo em seguida secas a temperatura ambiente para sua utilização nos bioensaios.

4.5.2 Bioensaio de Germinação de Sementes

Neste bioensaio a germinação das sementes, das duas espécies receptoras (*Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*), foi monitorada por 8 dias, onde as sementes germinadas foram contadas diariamente, sendo consideradas germinadas as sementes com extensão radicular igual ou maior a 2 mm (JUNTILA, 1976). O bioensaio foi conduzido em câmara tipo BOD (Fanem, 347), em condições controladas, à temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas, para ambas as espécies receptoras (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). As placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro, foram forradas com uma folha de papel filtro qualitativo recebendo em seguida, 10 sementes cada.

A partir dos resultados obtidos, calcularam-se as variáveis tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), porcentagem de germinação (PG), porcentagem de sementes dormentes (PSD) e mortas (PSM) e porcentagem de plântulas normais (PPN), anormais (PPA) e mortas (PM) conforme as equações descritas a seguir.

Tempo Médio de Germinação (TMG):

$$TMG = \frac{\sum n_i \times t_i}{\sum n_i} \quad (\text{LABOURIAU, 1983})$$

onde: - n_i é o número de sementes germinadas no tempo i ;

- t_i é o tempo em dias após o início do bioensaio;

- Ambos com $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ e 8 ;

- Unidade: dias.

Velocidade Média de Germinação (VMG):

$$VMG = \frac{1}{t} \quad (\text{LABOURIAU, 1983})$$

onde: - t é o tempo médio de germinação (TMG);

- Unidade: Sementes/dia.

Porcentagem de Germinação (PG):

$$G = \left(\frac{N}{T}\right) \times 100 \quad (\text{BRASIL, 1992})$$

- onde: - N é o número de sementes germinadas (contagem do último dia);
 - T é o número total de sementes dispostas para germinar;
 - Unidade: %.

Porcentagem de Sementes Dormentes (PSD) e Mortas (PSM):

$$SD = \left(\frac{D}{T}\right) \times 100 \quad \text{e} \quad SM = \left(\frac{M}{T}\right) \times 100 \quad (\text{OLIVEIRA et al., 2010})$$

- onde: - D é o número de sementes dormentes (não germinaram);
 - M é o número de sementes mortas (não germinaram);
 - T é o número total de sementes dispostas para germinar;
 - Unidade: %.

Porcentagem de Plântulas Normais (PPN), Anormais (PPA) e Mortas (PM):

$$PN = \left(\frac{Nr}{T}\right) \times 100 \quad , \quad PA = \left(\frac{A}{T}\right) \times 100 \quad (\text{OLIVEIRA et al., 2010})$$

$$\text{e} \quad PM = \left(\frac{M}{T}\right) \times 100$$

- onde : - Nr é o número de plântulas normais;
 - A é o número de plântulas Anormais (com má formação e/ou necrose);
 - M é o número de plântulas mortas;
 - T é o número total de sementes dispostas para germinar;
 - Unidade: %.

4.5.3 Bioensaio de Crescimento de Radícula e Hipocótilo

O bioensaio foi realizado em câmaras tipo BOD (Fanem, 347), à temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas, para ambas as espécies receptoras. Cada placa de petri, forrada com uma folha de papel filtro qualitativo receberam 5 sementes,

pré-germinadas em caixas transparentes do tipo Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), com dois dias de germinação. O alongamento da radícula e do hipocótilo foi monitorado por um tempo de 8 dias, sendo todos os dias medido o crescimento destes (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

Por meio dos resultados deste bioensaio pode-se calcular a média de crescimento da radícula e do hipocótilo das plântulas, submetidos aos diferentes tratamentos, como também a porcentagem de plântulas mortas.

4.5.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foi aplicado um delineamento experimental inteiramente casualizado com três réplicas. Os resultados de todas as variáveis calculadas nos dois bioensaios, para as duas espécies receptoras e para as diferentes concentrações dos extratos brutos, foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e avaliados pelo teste F e, em ocorrência de uma diferença estatística significativa, as médias foram comparadas com o teste de Tukey, ambos os testes com 5% de significância.

A análise estatística foi realizada no programa R Project (Team, R. Core. "R: A language and environment for statistical computing." (2012)), com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2013).

4.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram submetidos a técnicas de cromatografia, como cromatografia em coluna (CC) utilizando coluna de 2,5 e 1,5 cm de diâmetro e como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,200 mesh ASTM) para o fracionamento dos extratos brutos de éter de petróleo e acetato de etila e sephadex (Merck) para o extrato bruto de metanol, cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel 60 de 0,2 mm de espessura (ALUGRAN-G/UV-F254) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando placas preparadas através de

uma emulsão de sílica-gel 60 (Carvalhes UV-245) em água destilada sobre placas de vidro (20 x 20 cm), sendo a camada sobreposta de 1 mm de espessura (SOUZA FILHO et al., 2005; SEBASTIÃO, 2010).

Como fase móvel nas diferentes técnicas cromatográficas, foram utilizados os solventes apropriados para cada ensaio, dentre eles hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol P. A. (Vetec Química Fina), e como reveladores foi utilizado, câmara de iodo ressublimado e radiação de luz ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 365 nm (SOUZA FILHO; LÔBO; ARRUDA, 2005).

As frações e substâncias isoladas resultantes do processo fitoquímico foram secas à temperatura ambiente para posterior elucidação estrutural.

4.6.1 Fracionamento do Extrato de Éter de Petróleo

Um grama do extrato bruto de éter de petróleo foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna (2,5 cm de diâmetro) em sílica gel 60 de 0,2 mm de espessura, utilizando diferentes proporções de solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 100 frações de ± 20 mL cada. As frações foram secas e posteriormente analisadas por CCD, sendo as frações agrupadas (Figura 8) de acordo com o fator de retenção (R_f) apresentado e padrão de revelação frente à radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e iodo ressublimado.

A fração em destaque vermelho na figura 8 foi submetida a CCDP, para se obter as substâncias que foram identificadas (Figura 9), as em destaque azul foram purificadas e estão em processo de identificação (Quadro 1) e as que não estão destacadas foram purificadas e armazenadas para futura identificação.

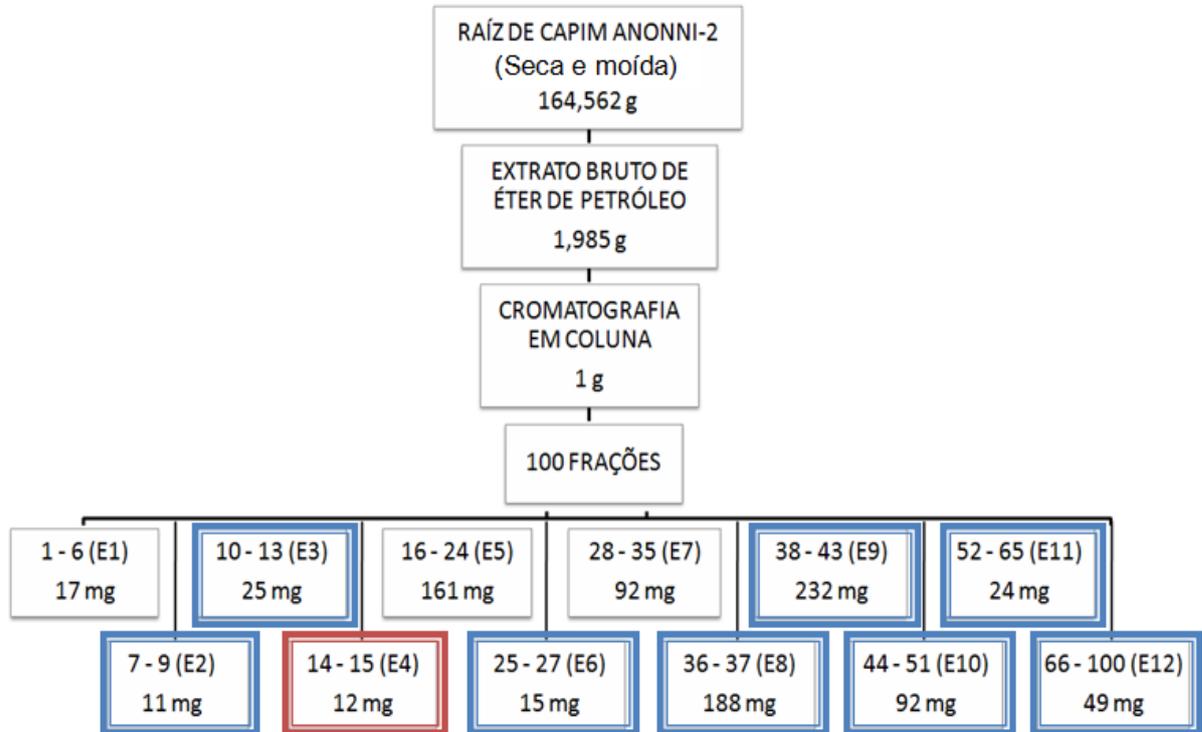


Figura 8 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de éter de petróleo.

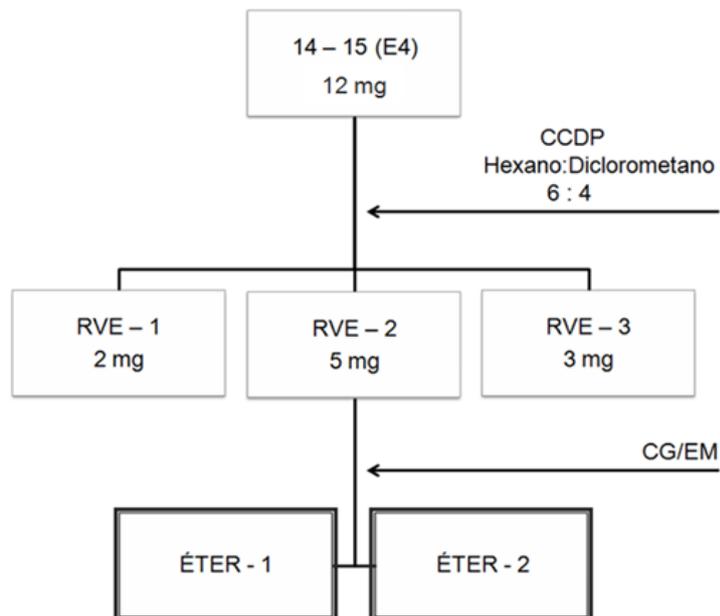
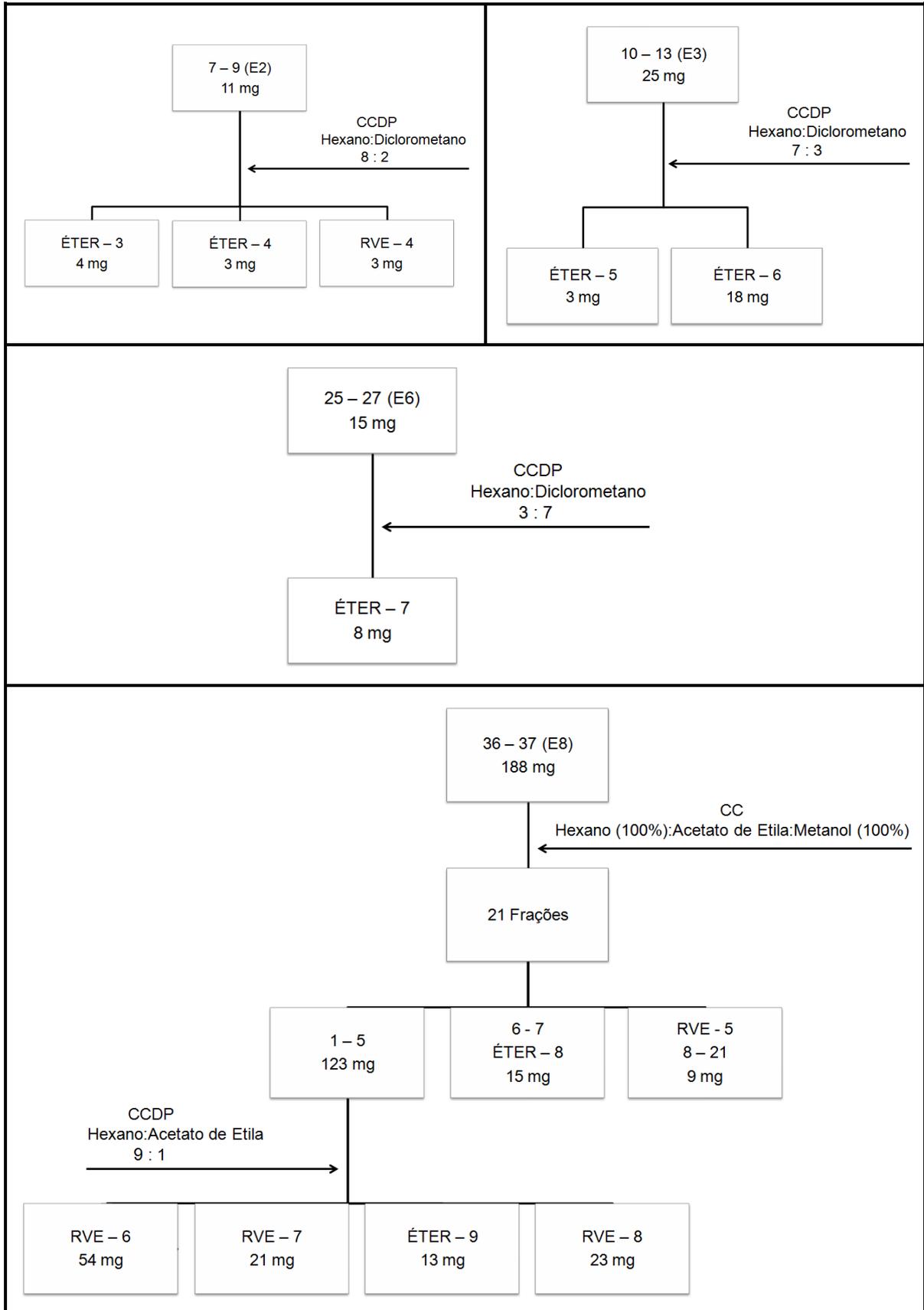


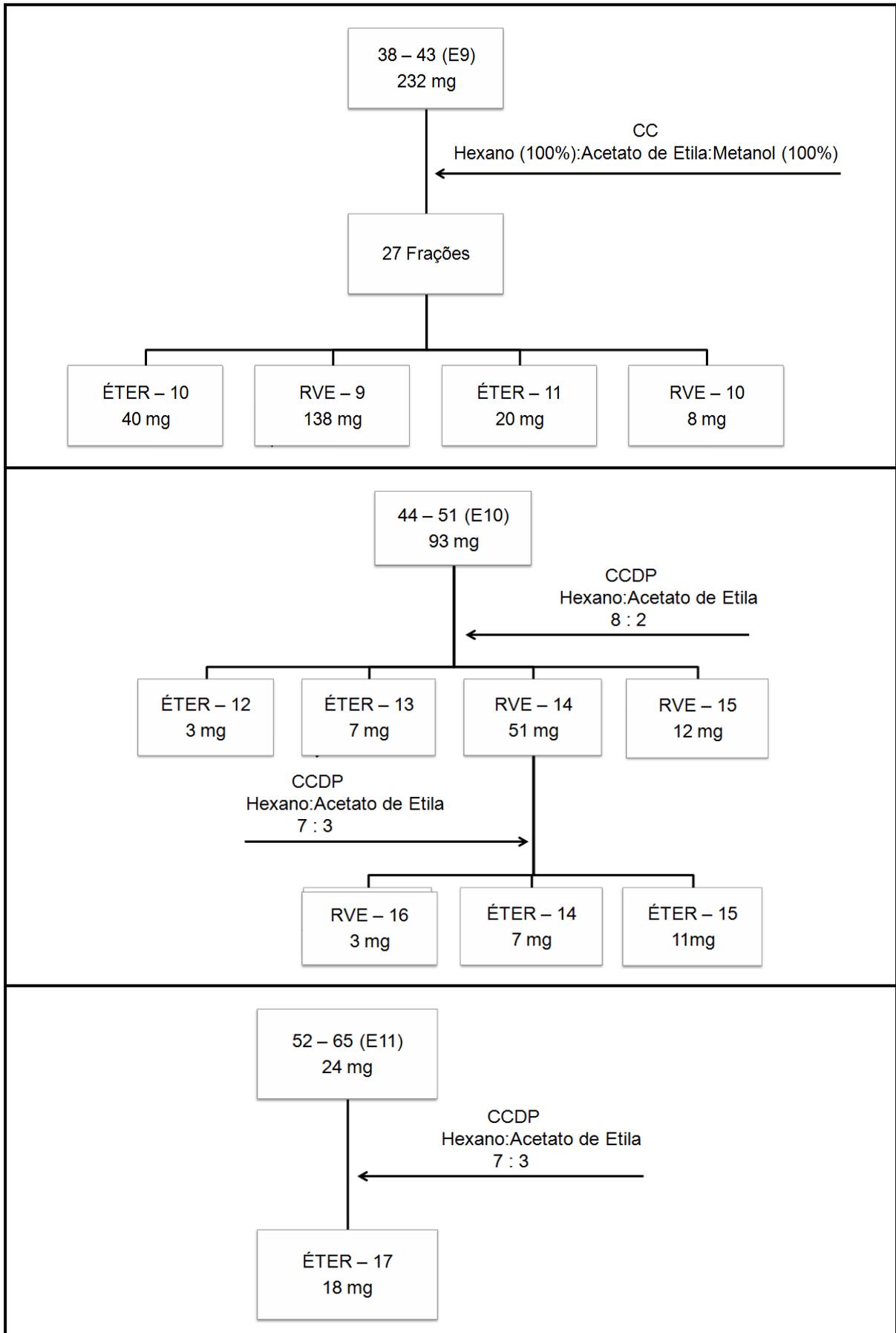
Figura 9 - Substâncias identificadas a partir do extrato bruto de éter de petróleo.

No quadro a seguir está sendo demonstrado o processo realizado para purificação das frações em destaque azul no fluxograma na figura 8.

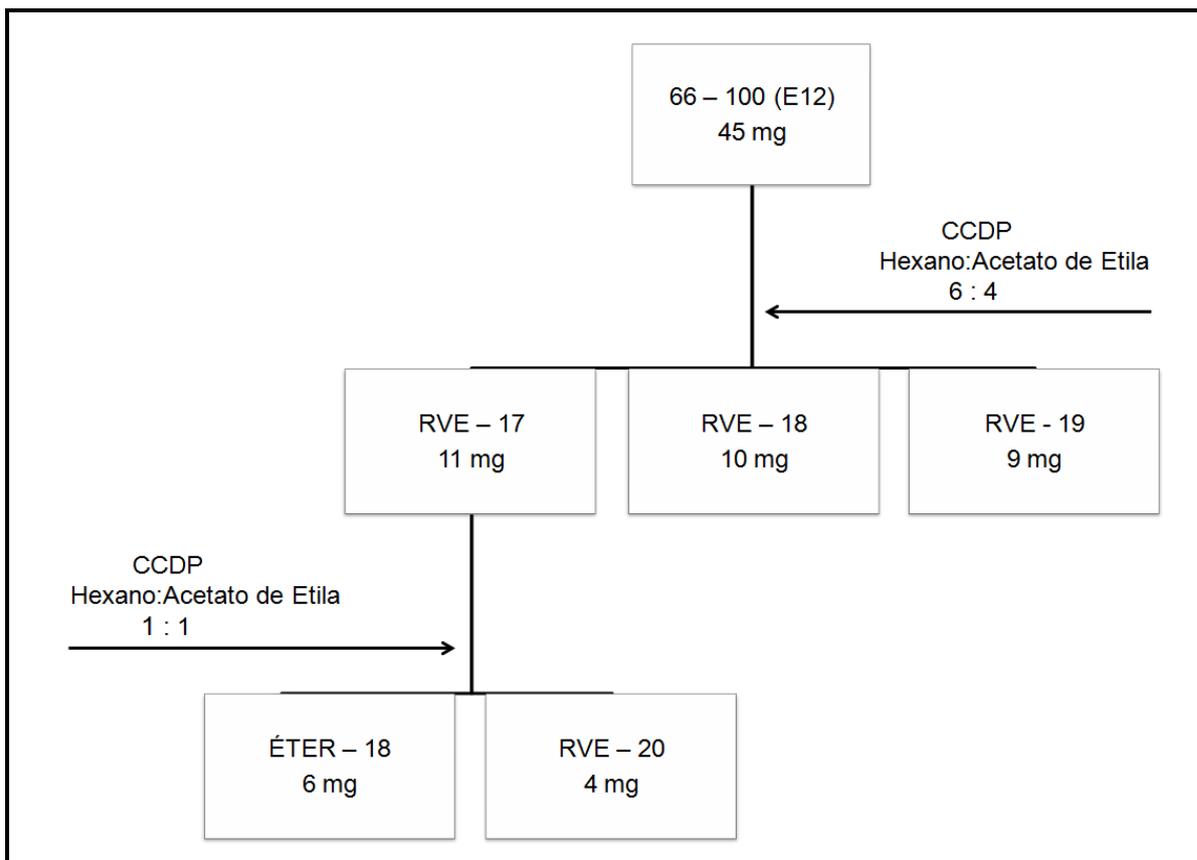
Quadro 1 - Fluxogramas das frações purificadas do extrato bruto de éter de petróleo. (continua)



(continua)



(conclusão)



Obs.: As substâncias identificadas como éter estão em processo de identificação e as identificadas como RVE estão armazenadas para futura identificação.

4.6.2 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila

Um grama do extrato bruto de acetato de etila foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna (2,5 cm de diâmetro) em sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura, utilizando diferentes proporções (9:1, 8:2, ..., 1:9) de solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 98 frações de ± 20 mL cada. As frações foram secas, e posteriormente analisadas por CCD, sendo as frações agrupadas (Figura 10) de acordo com o fator de retenção (R_f) apresentado e padrão de revelação frente a radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e iodo ressublimado.

As frações em destaque azul foram purificadas e estão em processo de identificação (Figura 10 e Quadro 2) e as que não estão destacadas foram purificadas e armazenadas para futura identificação.

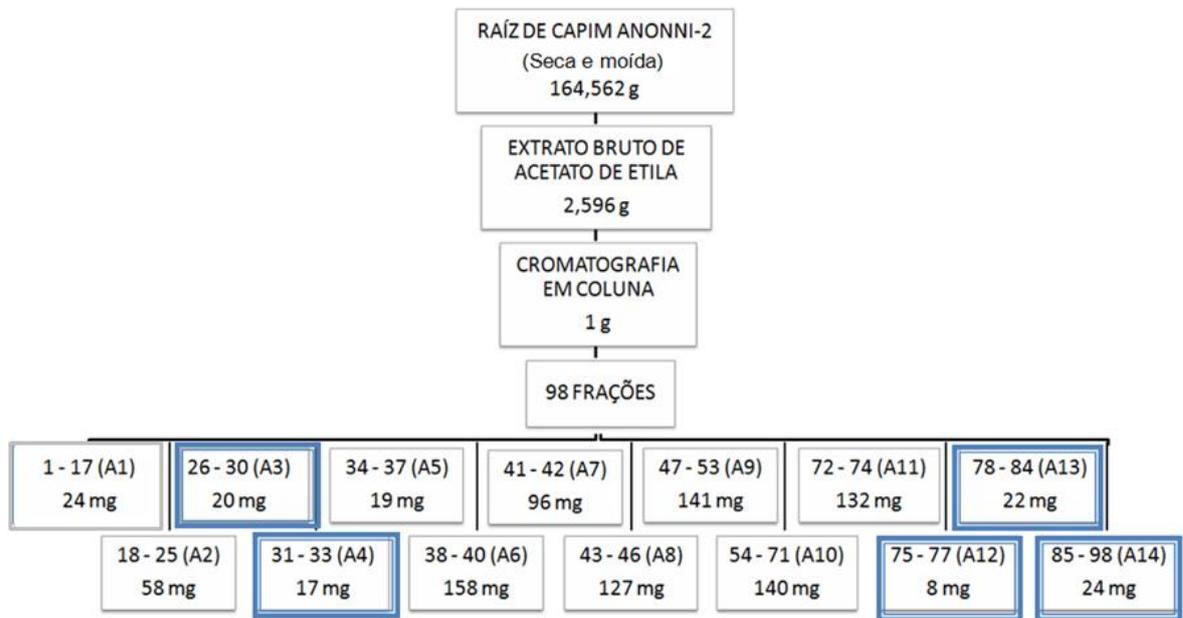
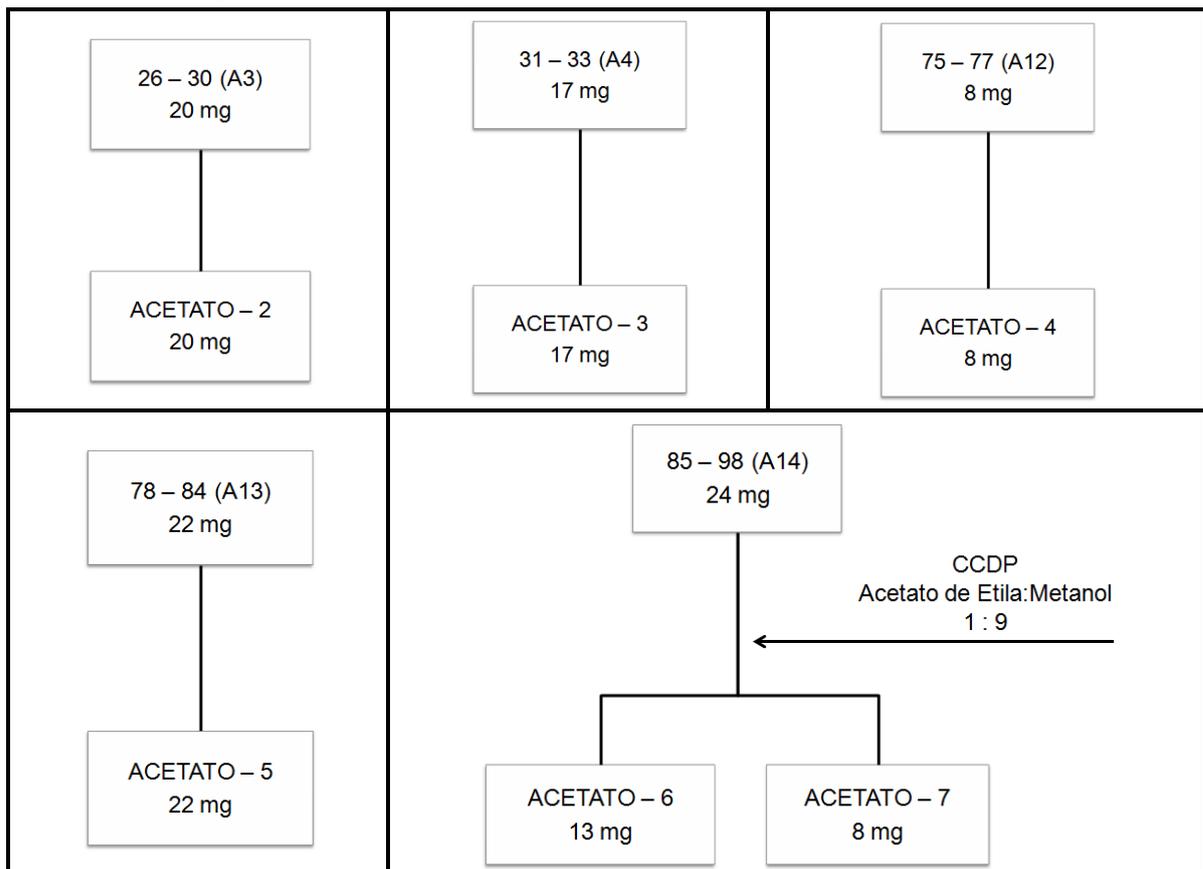


Figura 10 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de acetato de etila.

No quadro a seguir está sendo demonstrado o processo realizado para purificação das frações em destaque azul no fluxograma na figura 10.

Quadro 2 - Fluxogramas das frações purificadas do extrato bruto de acetato de etila.



Obs.: As substâncias identificadas como acetato estão em processo de identificação.

4.6.3 Fracionamento do Extrato de Metanol

O extrato bruto de metanol (650 mg), foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna (2,5 cm de diâmetro) em sephadex, utilizando diferentes proporções de água destilada e metanol, obtendo-se 176 frações de ± 4 mL cada. As frações foram secas, com circulação de ar a temperatura ambiente, e posteriormente analisadas por CCD, sendo as frações agrupadas (Figura 11) de acordo com o fator de retenção (R_f) apresentado e padrão de revelação frente à radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e iodo ressublimado.

A fração em destaque vermelho na figura 11 está sendo proposta a estrutura, as em destaque azul foram purificadas e estão em processo de identificação (Quadro 3) e as que não estão destacadas foram purificadas e armazenadas para futura identificação.

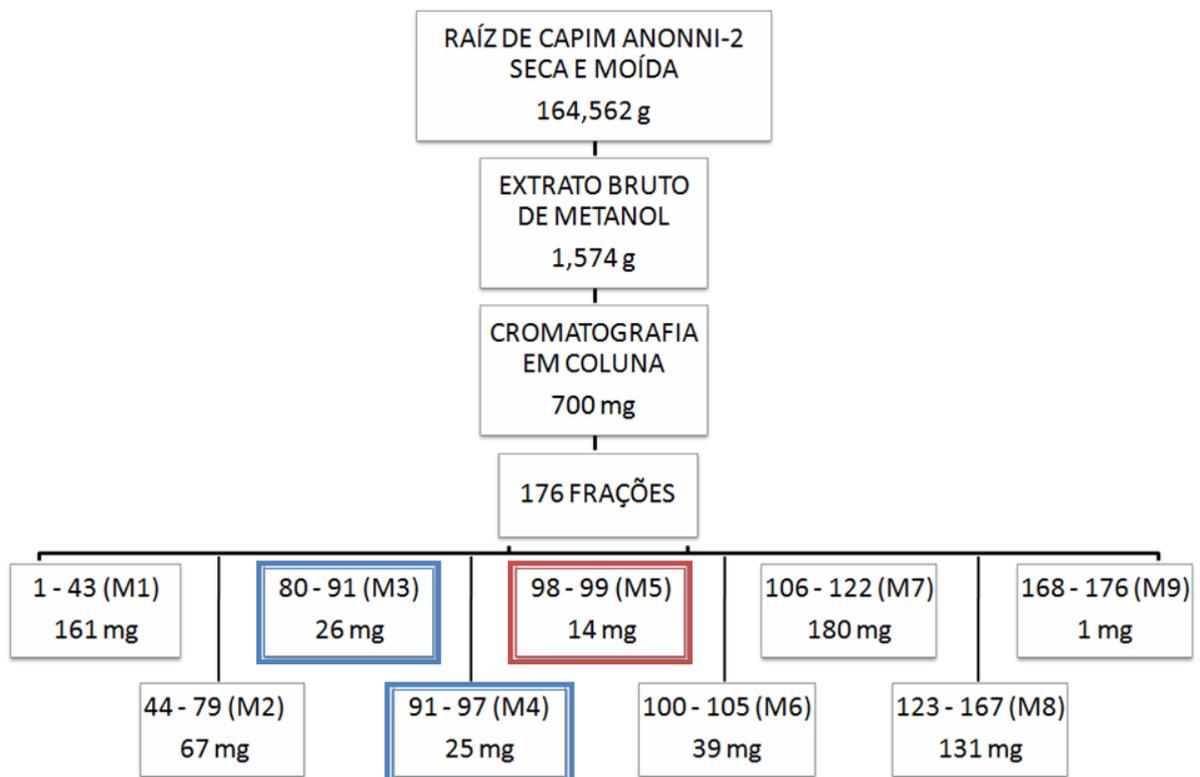
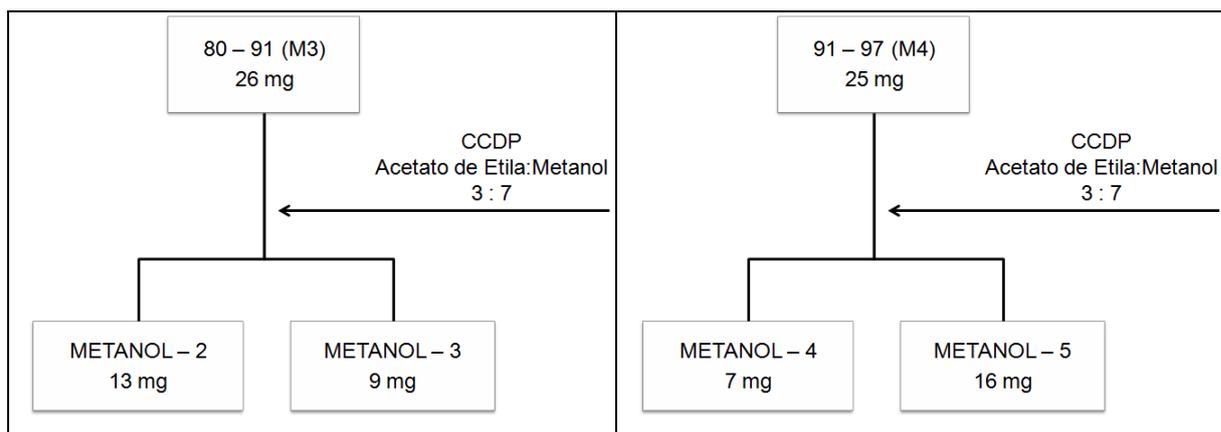


Figura 11 - Agrupamento das frações provenientes do extrato bruto de metanol.

No quadro a seguir está sendo demonstrado o processo realizado para purificação das frações em destaque azul no fluxograma na figura 11.

Quadro 3 - Fluxogramas das frações purificadas do estrato bruto de metanol.

Obs.: As substâncias identificadas como metanol estão em processo de identificação.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os compostos isolados foram identificados por meio de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono (RMN de ^{13}C), utilizando os espectrômetros AC-200 ou Advance-400 (Bruker), operando respectivamente a 200 e 400 MHz para hidrogênio e 50 e 100 MHz para carbono, sendo estas análises realizados no Departamento de Química da UFPR. Para a realização das análises, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (99,8%) (Aldrich) e como padrão de referência foi utilizando tetrametilsilano (TMS). Também utilizou-se CG/EM, usando cromatógrafo gasoso (Varian 431-CG) acoplado a espectrômetro de massas (Varian 210-MS) nas seguintes condições: coluna VF-5ms (30m x 0,25mm x 0,25 μm), temperatura de injeção 250 °C, rampa de aquecimento 60 °C - 3 °C/min - 240 °C, gás hélio e fluxo de 1 mL/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA E PREPARO DA RAÍZ DE CAPIM ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)

O Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) foi coletado de uma área infestada no campo experimental do curso de Agronomia da UTFPR – câmpus Pato Branco (Figura 12) na estação do verão, isto, devido a estudos anteriores que compararam o efeito alelopático desta planta com extratos de verão e inverno, obtendo-se melhores resultados com os extratos preparados a partir da coleta desta na estação do verão (DALBOSCO, 2013).



Figura 12 - Área de coleta do Capim Annoni-2 - campo experimental do curso de Agronomia da UTFPR - câmpus Pato Branco.

Após a coleta separou-se a planta em raíz, folha e sementes, sendo estes dois últimos armazenados para estudos futuros, e as raízes lavadas, secas (Figura 13) e moídas (Figura 14).



Figura 13 - Secagem das raízes de Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees).



Figura 14 - Moagem das raízes secas de Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees).

Posterior as raízes foram utilizados no preparo dos extratos brutos.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos obtidos por meio da extração exaustiva à frio de 164 gramas de raízes de *E. plana* Nees, que foram posteriormente rota-evaporados para completa remoção dos solventes (Figura 15), renderam 1,98; 2,59 e 1,57 gramas de extrato bruto de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, respectivamente (Tabela 2).



Figura 15 - Extrato bruto de metanol sendo rota-evaporado.

Tabela 2 - Rendimento dos extratos brutos.

Extrato bruto	Massa seca (g)	Rendimento (%)
Éter de petróleo	1,98	3,27
Acetato de etila	2,59	4,22
Metanol	1,57	2,59

5.3 INFRAVERMELHO

Os três extratos brutos obtidos foram submetidos à análise em infravermelho (Figura 16) e posteriormente analisados estatisticamente, para comprovar as diferenças e/ou semelhanças entre si, através da análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Os espectros obtidos para os extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol podem ser observados na figura 17.

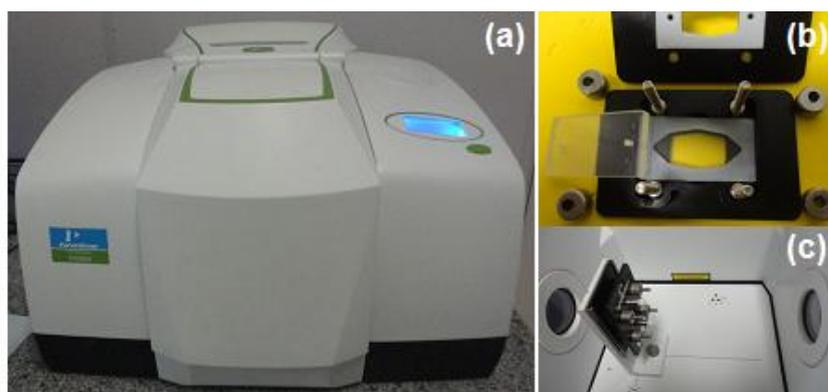


Figura 16 - (a) Infravermelho, (b) suporte e placas de KBr e (c) Interior do infravermelho com o suporte.

Os espectros no infravermelho foram divididos em quatro regiões distintas, a região 1 na faixa de 4000 a 2500 cm^{-1} , a região 2 de 2500 a 2000 cm^{-1} , a região 3 de 2000 a 1500 cm^{-1} e a região 4 na faixa abaixo de 1500 cm^{-1} , estas correspondentes respectivamente a absorções referentes a estiramentos de ligações simples de N, C e O com H, triplas $\text{N}\equiv\text{N}$ e $\text{C}\equiv\text{C}$, duplas de C com C, O e N, e ligações simples C-C, C-O, C-N e C-X (halogênio) (MCMURRY, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

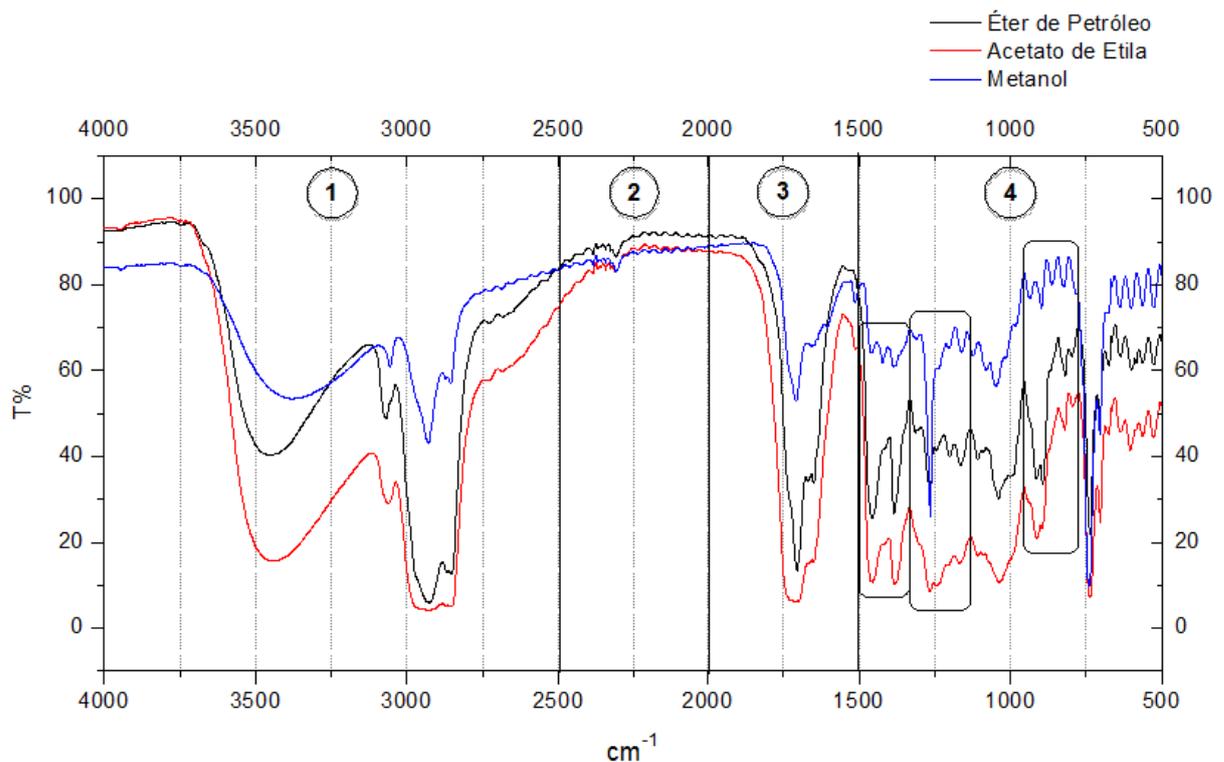


Figura 17 - Espectros no infra vermelho dos extratos brutos de éter de petróleo (em preto), acetato de etila (em vermelho) e metanol (em azul).

Com base nesta subdivisão, os espectros dos três extratos analisados apresentam-se semelhantes nas regiões 1, 2 e 3 e distintos na região 4 (picos em evidência na figura 17). Desta forma os extratos apresentam na região 1 absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) entre 3600 e 3200 cm^{-1} , bandas de deformação axial C-H de aromáticos entre 3000 e 3100 cm^{-1} , que coligadas a sinais na região 4 entre 900 e 650 cm^{-1} reforçam a presença destes compostos e bandas entre 3000 e 2760 cm^{-1} correspondentes a deformações axiais de ligações C-H de grupamentos metila e metileno. Na região 2 eles apresentam absorção entre 2375 a 2250 cm^{-1} provável de estiramento de ligação tripla $\text{C}\equiv\text{C}$. Na região 3 observa-se também em todos os extratos banda entre 1850 e 1600 cm^{-1} referente a ligações $\text{C}=\text{O}$. Finalmente observou-se na região 4 absorções entre 1480 e 1000 cm^{-1} correspondentes a deformação angular CH_2 e/ou CH_3 e deformação axial de ligações $\text{C}=\text{C}$ e $\text{CH}_3\text{-CO}$ e bandas entre 1300 e 1000 cm^{-1} frequentemente designadas a deformação axial C-O (MCMURRY, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Com os dados de infravermelho dos extratos brutos realizou-se a análise estatística de PCA e HCA, a fim de comprovar estatisticamente a diferença entre os

extratos obtidos por meio de solventes com diferentes polaridades. Estas análises são consideradas análises exploratórias, que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados (SOUSA et al., 2009; PANERO et al., 2006).

Os resultados da PCA geraram um gráfico da primeira componente principal versus a segunda (PC1 versus PC2) (Gráfico 1) o qual separou os dados espectrais dos extratos brutos em três grupos distintos. Já os resultados da HCA são apresentados na forma de um dendrograma (Figura 18), o qual agrupou os extratos em função das suas similaridades.

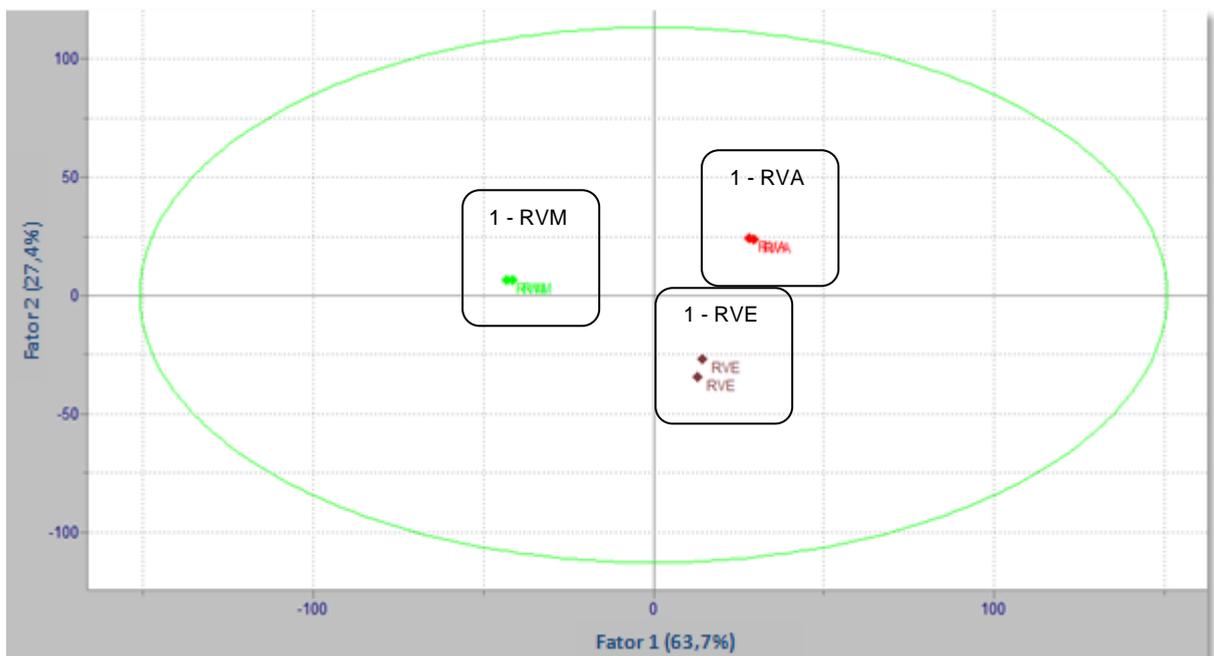


Gráfico 1 - Gráfico resultante da análise de PCA, onde Fator 1 e 2 correspondem respectivamente a PC1 e PC2, e RVE, RVA e RVM aos extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol respectivamente.

Analisando-se o gráfico da PCA pode-se constatar que as componentes principais PC1 e PC2 descrevem 91,1% da variação total dos dados originais, sendo que a primeira componente principal (PC1) representa 63,7% enquanto que a segunda componente principal (PC2) representa 27,4%, assim esta análise é mais significativa segundo a PC1.

Também de acordo com a PC1 (63,7%) pode-se verificar que os extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol apresentam diferenças entre si, sendo mais específico, há uma certa similaridade entre o extrato de éter de petróleo e acetato de etila e ambos se distanciam do extrato de metanol, isto provavelmente

se deve a diferença de polaridade dos solventes utilizados levando conseqüentemente a extração de compostos mais apolares no caso do éter de petróleo e mais polares no metanol, gerando assim bandas diferenciadas nos espectros no infravermelho, principalmente na região 4, como pode ser observado na figura 17.

Em relação a PC2 (27,4%) os dados se comportaram da mesma forma que na PC1, no entanto os extratos de acetato de etila e metanol apresentarem similaridade entre si e ambos distanciaram-se do extrato de éter de petróleo. Através desta análise conclui-se a diferença significativa entre os extratos, principalmente entre o de éter de petróleo e de metanol, tanto pela PC1 quanto pela PC2, diferença já esperada, em função das polaridades distintas dos solventes em questão, já o extrato de acetato de etila, por ser extraído com um solvente de média polaridade, apresenta semelhanças com os outros dois extratos em estudo dependendo da análise pela PC1 (com o extrato de éter de petróleo) ou PC2 (com o extrato de metanol).

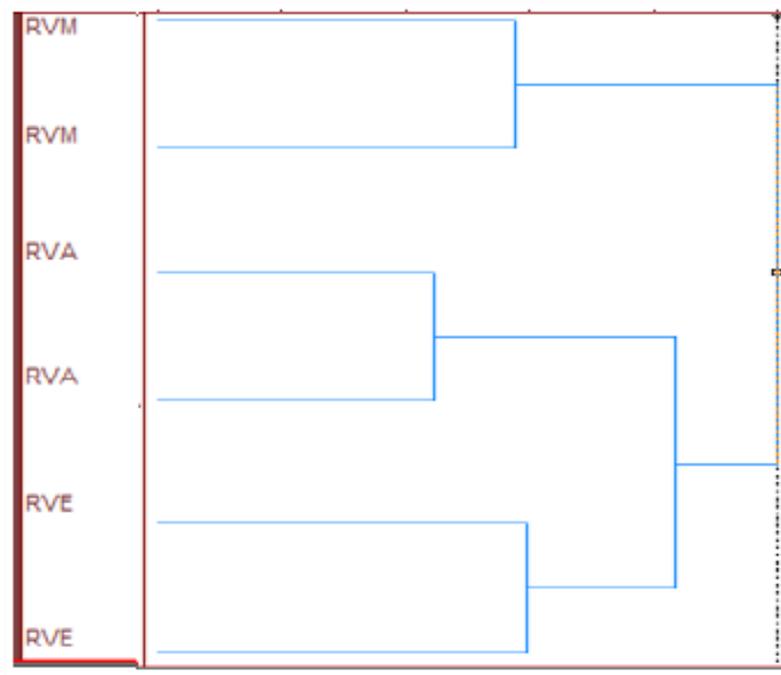


Figura 18 - Dendrograma resultante da análise de HCA, onde RVE, RVA e RVM correspondem respectivamente aos extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol.

Os resultados observados através da análise de PCA foram confirmados no dendrograma obtido pela HCA (Figura 18), ou seja, é possível observar a formação de dois grupos distintos, um para o extrato bruto de éter de petróleo e acetato de

etila e outro para o extrato bruto de metanol, isto igual ao representado pela PC1 na PCA (Gráfico 1), que é a componente principal que representa a maior parte dos dados (63,7%).

5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS

5.4.1 Preparo das Soluções e Determinação do Potencial Osmótico

Os testes alelopáticos foram realizados a partir de soluções dos extratos brutos concentrados, estas foram preparadas nas concentrações de 600, 400 e 200 ppm, utilizando uma proporção em massa de extrato e Tween 80 de 1:1, para haver a completa dissolução do extrato em água destilada. Como branco foi utilizado água destilada, e como controle a proporção 1:1 de maior massa (600 ppm) entre os solventes utilizados nas extrações e Tween 80 (Figura 19), para verificar a influência ou não, destes nos testes alelopáticos, em caso positivo, poderia mascarar os resultados reais gerados pelos extratos.

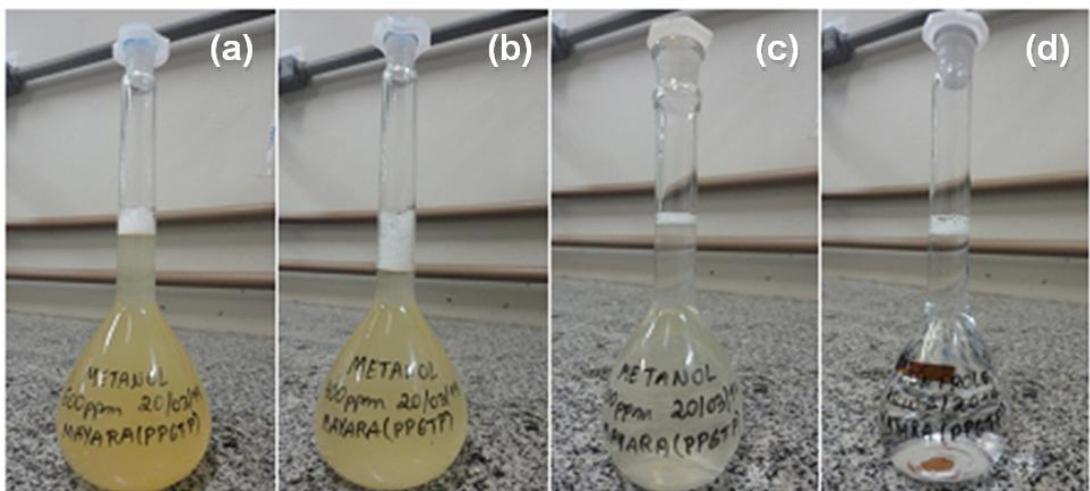


Figura 19 - Soluções do extrato bruto de metanol, (a) 600 ppm, (b) 400 ppm, (c) 200 ppm e (d) Controle (metanol + Tween).

Com estas soluções de todos os extratos brutos foi realizado, anterior aos testes alelopáticos, um ensaio para determinar o potencial osmótico destes pelo método de Schardakow, obtendo-se como resultado uma variação entre 0,000 a

0,026 MPa para todas as soluções testadas (Figura 20). De acordo com Rego et al. (2007), somente potenciais osmóticos maiores que 0,600 MPa influenciaram a germinação da espécie *Anadenanthera colubrina*.

Assim, é possível concluir que os potenciais osmóticos apresentados pelas soluções, dos extratos brutos e controle, não causou nenhum efeito osmótico prejudicial, durante a realização dos bioensaios, nas espécies receptoras. Desta forma, não houve influência nos resultados apresentados nos testes alelopáticos, o que poderia encobrir os efeitos reais dos extratos em estudo sobre as espécies receptoras.

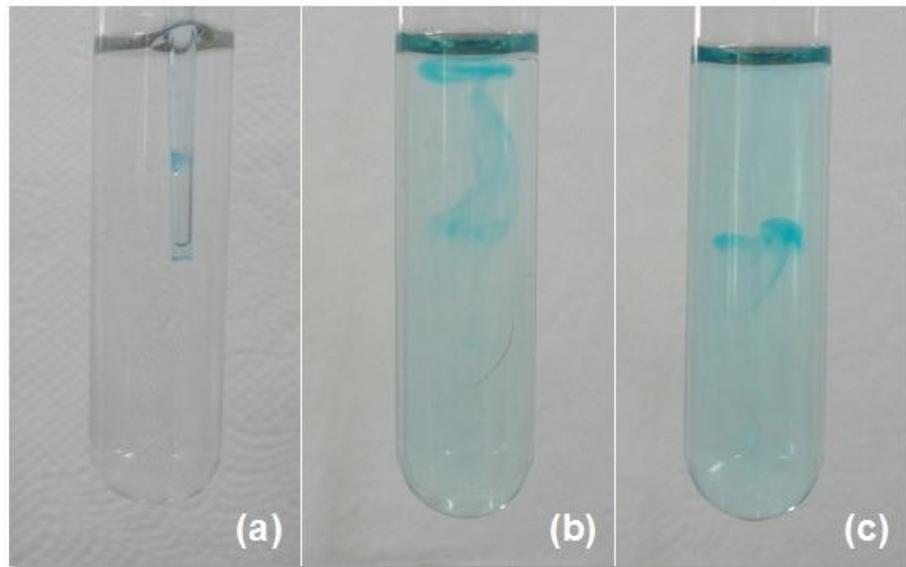


Figura 20 - Teste de Schardakow (método da gota): (a) colocando a gota (10 μ L) da solução a ser testada colorida com azul de metileno na solução de glicose (0,001 mol/L), (b) exemplo de uma solução em que a gota subiu resultando em um potencial osmótico menor que 0,026 MPa, (c) exemplo de uma solução em que a gota ficou em equilíbrio com a solução de glicose resultando em um potencial osmótico de 0,026 MPa.

5.4.2 Espécies Receptoras (Pré-análise)

Para a realização dos testes alelopáticos, as sementes das espécies receptoras utilizadas, leiteira (*E. heterophylla*) e corda de viola (*I. grandifolia*), passaram por um processo de desinfecção e no caso da *I. grandifolia* pela quebra de dormência (Figura 21).

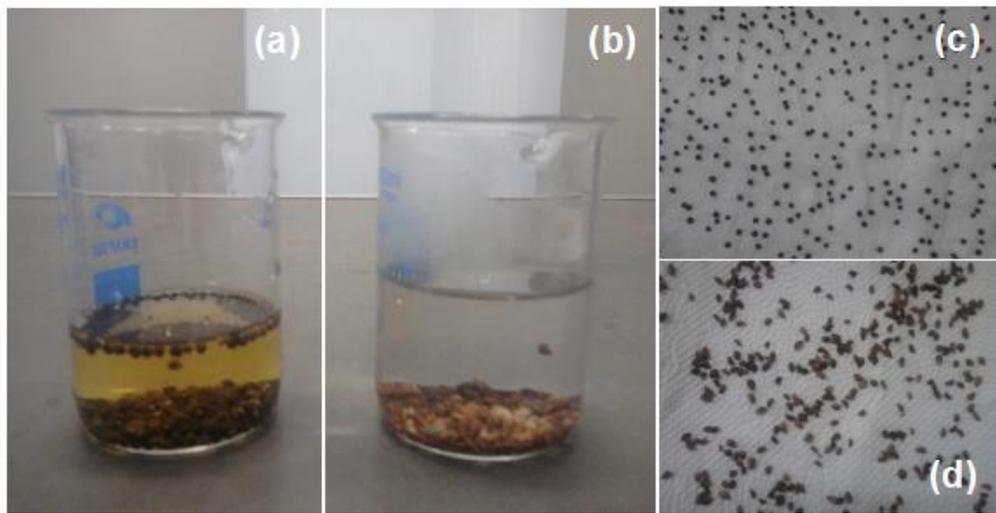


Figura 21 - (a) desinfecção das sementes de *E. heterophylla*, (b) quebra de dormência das sementes de *I. grandifolia*, (c) e (d) sementes de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*, respectivamente, secas e prontas para análise de germinação e/ou germinação em caixas tipo Gerbox para análise de crescimento.

As sementes destinadas para análise de crescimento de hipocótilo e radícula, após desinfecção e/ou quebra de dormência, foram germinadas durante 48 horas e posteriormente usadas para a realização da análise (Figura 22).

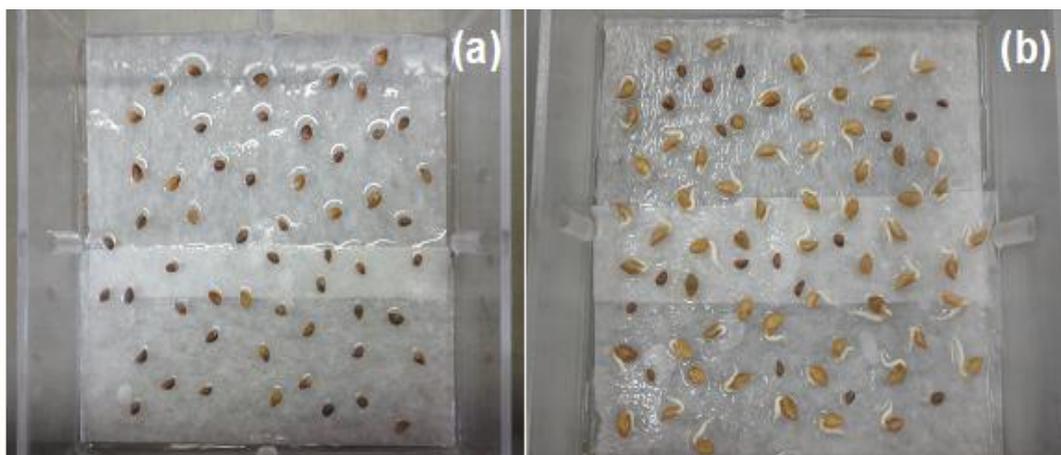


Figura 22 - (a) sementes de *I. grandifolia* postas para germinar em caixas tipo Gerbox e (b) sementes após dois dias de germinação.

5.4.3 Bioensaio de Germinação

O bioensaio foi realizado em triplicata, utilizando as soluções dos extratos brutos nas concentrações de 200, 400 e 600 ppm e branco e controle, sendo que foi adicionado em cada placa de petri 5 mL destas (Figura 23), e a partir de então apenas 1 mL de água destilada a cada 24 horas.

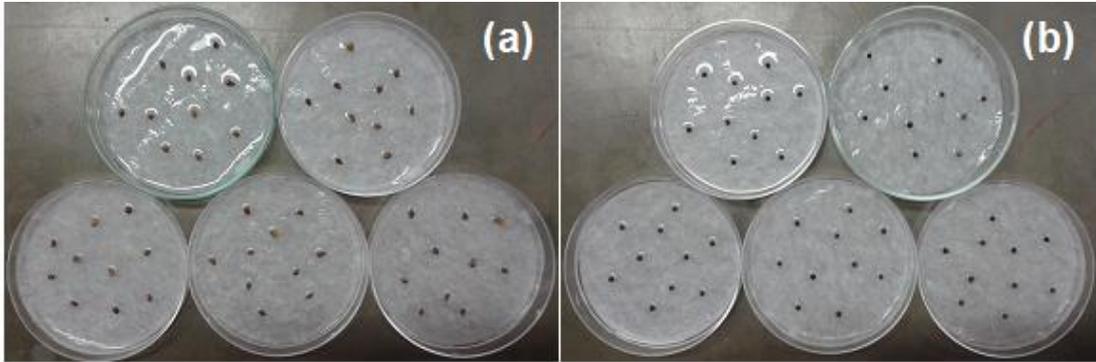


Figura 23 - Início do teste de germinação, (a) sementes de *I. grandifolia* e (b) sementes de *E. heterophylla*.

As duas espécies receptoras foram monitoradas durante 8 dias, sendo que, as sementes germinadas foram contadas diariamente, e no último dia realizou-se a contagem de sementes dormentes e mortas (Figura 24), e de plântulas normais, anormais e mortas (Figura 25).

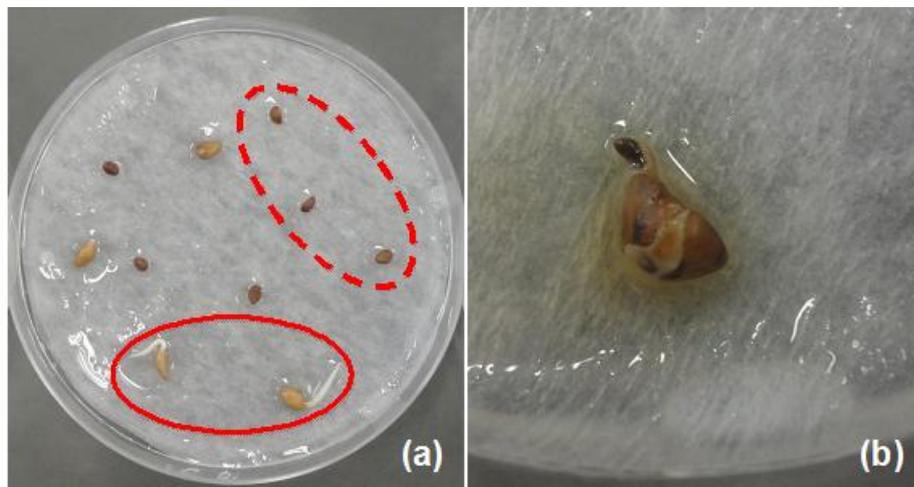


Figura 24 - Exemplos: (a) — sementes germinadas e - - - sementes dormentes e (b) semente morta.

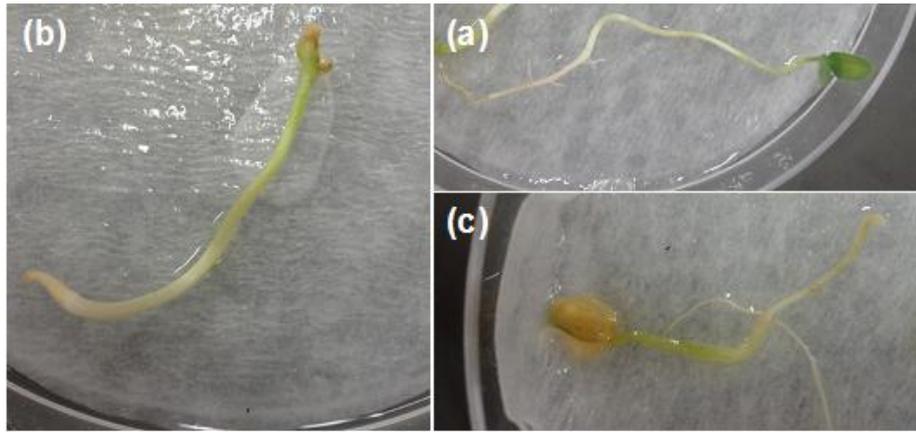


Figura 25 - Exemplo *E. heterophylla*: (a) plântula normal, (b) plântula anormal e (c) plântula morta.

Os resultados podem ser observados nos quadros 4 e 5.

Quadro 4 - Resultados do bioensaio de germinação para a espécie receptora *I. grandifolia*.

Espécie Receptora	Extratos Brutos	Concentrações (ppm)	Número de Sementes Germinadas (8 ^o dia)	Número de Sementes Dormentes	Número de Sementes Mortas	Número de Plântulas Normais	Número de Plântulas Anormais	Número de Plântulas Mortas
Corda de Viola (<i>Ipomoea grandifolia</i>)	Éter de Petróleo	Branco	7,67	2,33	0,00	7,67	0,00	0,00
		Controle	7,33	2,67	0,00	7,33	0,00	0,00
		200	3,33	2,67	4,00	1,67	1,33	0,33
		400	2,67	2,33	5,00	1,33	0,67	0,67
		600	3,00	2,33	4,67	1,33	1,00	0,67
	Acetato de Etila	Branco	7,33	2,67	0,00	7,33	0,00	0,00
		Controle	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		200	4,00	3,00	3,00	1,33	1,67	0,33
		400	3,33	2,67	4,00	1,67	1,00	1,00
		600	3,67	2,67	3,67	1,67	1,33	0,67
	Metanol	Branco	7,33	2,67	0,00	7,33	0,00	0,00
		Controle	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		200	4,33	2,67	3,00	2,00	1,33	1,00
		400	5,67	2,67	2,00	3,00	2,00	0,67
		600	5,00	3,00	2,00	2,33	1,67	1,00

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas do 8^o dia do bioensaio.

Quadro 5 - Resultados do bioensaio de germinação para a espécie receptora *E. heterophylla*.

Espécie Receptora	Extratos Brutos	Concentrações (ppm)	Número de Sementes Germinadas (8º dia)	Número de Sementes Dormentes	Número de Sementes Mortas	Número de Plântulas Normais	Número de Plântulas Anormais	Número de Plântulas Mortas
Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>)	Éter de Petróleo	Branco	7,33	2,67	0,00	7,33	0,00	0,00
		Controle	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		200	3,00	2,67	4,33	1,67	1,33	0,00
		400	2,67	2,33	5,00	1,33	1,00	0,33
		600	2,33	2,67	5,00	1,00	0,67	0,67
	Acetato de Etila	Branco	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		Controle	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		200	2,00	2,67	5,67	1,67	0,00	0,00
		400	1,67	3,00	5,67	1,00	0,33	0,00
		600	1,33	3,00	6,00	0,00	0,67	0,33
	Metanol	Branco	7,00	3,00	0,00	7,00	0,00	0,00
		Controle	6,67	3,33	0,00	6,67	0,00	0,00
		200	1,67	3,33	5,00	0,67	0,67	0,33
		400	2,33	3,00	4,67	1,33	1,00	0,00
		600	1,33	3,00	6,00	0,33	0,00	0,67

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas do 8º dia do bioensaio.

Os dados em destaque (em negrito) nos quadros 4 e 5 representam os melhores resultados para as variáveis avaliadas dentre todos os extratos para o bioensaio de germinação com as espécies receptoras *I. grandifolia* e *E. heterophylla*, respectivamente. Através destes resultados pode-se dizer qualitativamente avaliando as sementes germinadas, principal variável do bioensaio, que o melhor tratamento para a espécie receptora *I. grandifolia* é frente ao extrato bruto de éter de petróleo na concentração de 400 ppm, já para a espécie receptora *E. heterophylla* os extratos brutos de acetato de etila e metanol, ambos a 600 ppm, foram os que apresentaram os melhores resultados.

A partir destes dados, calculou-se as variáveis TMG, VMG e PG (Quadro 6 e 7), que foram avaliadas estatisticamente em relação as concentrações das soluções de todos os extratos brutos e espécies receptoras utilizadas.

Quadro 6 - Resultados das variáveis TMG, VMG e PG para a espécie receptora *I. grandifolia*.

Espécie Receptora	Extratos Brutos	Concentrações (ppm)	Tempo Médio de Germinação (dias)	Velocidade Média de Germinação (sementes/dia)	Porcentagem de Germinação (%)
Corda de Viola (<i>Ipomoea grandifolia</i>)	Éter de Petróleo	Branco	1,22	0,82	76,7
		Controle	1,36	0,74	73,3
		200	3,75	0,27	33,3
		400	4,72	0,22	26,7
		600	4,19	0,25	30,0
	Acetato de Etila	Branco	1,23	0,82	73,3
		Controle	1,28	0,79	70,0
		200	3,12	0,32	40,0
		400	4,92	0,20	33,3
		600	4,36	0,23	36,7
	Metanol	Branco	1,23	0,82	73,3
		Controle	1,29	0,78	70,0
		200	3,85	0,26	43,3
		400	3,28	0,31	56,7
		600	3,46	0,29	50,0

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas.

Quadro 7 - Resultados das variáveis TMG, VMG e PG para a espécie receptora *E. heterophylla*.

Espécie Receptora	Extrato Bruto	Concentrações (ppm)	Tempo Médio de Germinação (dias)	Velocidade Média de Germinação (sementes/dia)	Porcentagem de Germinação (%)
Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>)	Éter de Petróleo	Branco	1,23	0,82	73,3
		Controle	1,29	0,78	70,0
		200	3,14	0,32	30,0
		400	4,00	0,25	26,7
		600	4,78	0,21	23,3
	Acetato de Etila	Branco	1,27	0,80	70,0
		Controle	1,28	0,79	70,0
		200	3,78	0,27	20,0
		400	4,33	0,24	16,7
		600	4,83	0,21	13,3
	Metanol	Branco	1,32	0,77	70,0
		Controle	1,40	0,73	66,7
		200	4,33	0,24	16,7
		400	3,28	0,31	23,3
		600	4,17	0,25	13,3

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas.

Os dados em destaque (em negrito) nos quadros 6 e 7 representam os melhores resultados dentre todos os extratos para as quatro variáveis avaliadas com as espécies receptoras *I. grandifolia* e *E. heterophylla*, respectivamente. Através destes resultados pode-se dizer qualitativamente que os melhores tratamentos para a espécie receptora *I. grandifolia* é frente ao extrato bruto de éter de petróleo e

acetato de etila, ambos na concentração de 400 ppm, já para a espécie receptora *E. heterophylla* o extrato bruto de acetato de etila na concentração de 600 ppm, foi o que apresentou melhores resultados, com destaque também para a concentração de 600 ppm dos outros dois extratos brutos.

Estatisticamente os resultados da análise de variância para *I. grandifolia* e *E. heterophylla* não apresentaram interação tripla significativa entre os tratamentos avaliados, espécie receptora vs. extrato vs. concentração, pois de acordo com o teste F as médias dos extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol são estatisticamente iguais, assim o efeito do potencial alelopático dependente das espécies receptoras e concentrações utilizadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da ANOVA para as variáveis tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e porcentagem de germinação (PG), plântulas normais (PPN) e sementes dormentes (PSD).

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio (QM)				
		TMG ^a	VMG	PG ^a	PPN ^b	PSD
Espécie (A)	1	0,0274 ^{ns}	0,0019 ^{ns}	268,98**	16,869**	111,11 ^{ns}
Extrato (B)	2	0,0958 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	8,5446 ^{ns}	0,4983 ^{ns}	130,00 ^{ns}
Concentração (C)	4	13,193**	1,5201**	576,10**	131,31**	29,440 ^{ns}
A x B	2	0,0777 ^{ns}	0,0047 ^{ns}	44,425**	3,5981**	7,7700 ^{ns}
A x C	4	0,0961 ^{ns}	0,0022 ^{ns}	33,756**	4,6883**	2,7700 ^{ns}
B x C	8	0,2024**	0,0061*	6,4976 ^{ns}	0,6909 ^{ns}	3,6110 ^{ns}
A x B x C	8	0,0290 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	7,8840 ^{ns}	1,0074 ^{ns}	11,94 ^{ns}
Resíduo	60	0,0482	0,0029	4,5503	0,5220	66,66
Total	89	0,6548	0,0712	35,982	6,8985	52,13

^a estimados a partir de dados transformados por Box-Cox.

^b estimados a partir de dados transformados por $\sqrt{(x + 1)}$.

* p≤0,05, ** p≤0,01 e ^{ns} p>0,05 pelo teste F.

A variável PSD não apresentou diferença estatística significativa dentre todos os ensaios realizados, o que prova a homogeneidade das sementes utilizadas no boiensaio, independente da espécie receptora.

Para a variável PG, principal resultado deste boiensaio, houve diferença estatística significativa entre as espécies e concentrações utilizadas, e na interação

espécie vs. extrato (Gráfico 2) e espécie vs. concentração (Gráfico 3). Assim, para a interação espécie vs. extrato, observa-se que ao final do oitavo dias de experimento, para a espécie receptora *I. grandifolia* os extratos mais efetivos sobre a inibição do processo germinativo foram o de éter de petróleo e acetato de etila, os quais são estatisticamente iguais. Estes, reduziram as porcentagens de sementes germinadas de 75% para 33,3%, inibindo cerca de 55,6% da germinação (Gráfico 2).

A espécie receptora *E. heterophylla* foi mais afetada pela aplicação dos extratos de acetato de etila e metanol, os quais foram considerados iguais pela análise estatística, havendo uma redução drástica na porcentagem de sementes germinadas de 70,0% para 17,2%, inibindo em média 75,4% da germinação (Gráfico 2). Desta forma, a germinação da espécie receptora *E. heterophylla* é mais suscetível ao efeito alelopático do Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees), destacando-se os extratos de acetato de etila e metanol.

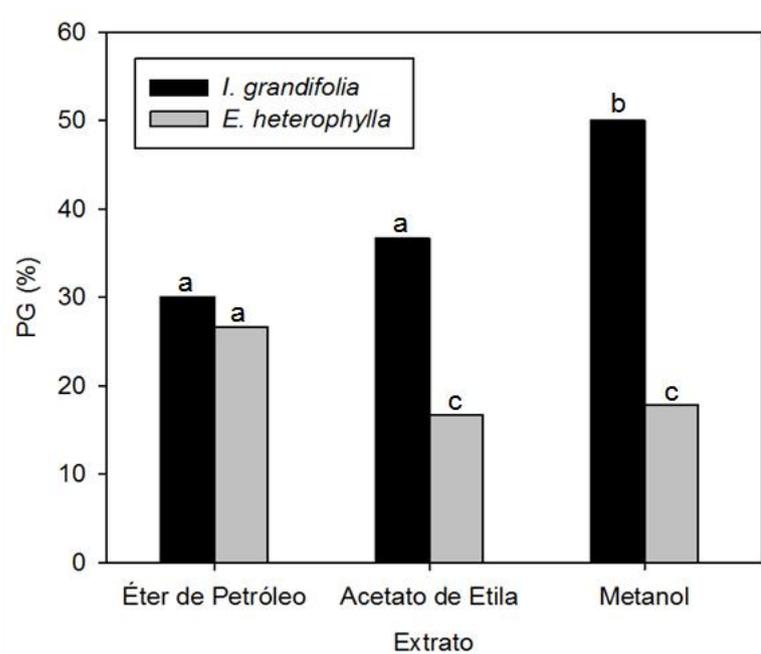


Gráfico 2 - Porcentagem de Germinação (PG) avaliando a interação Espécie vs. Extrato. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A interação concentração vs. espécie, prova que o efeito alelopático sobre a germinação de ambas as espécies receptoras ocorre realmente por parte dos extratos aplicados, independente da concentração utilizada, já que estatisticamente as médias do branco e do controle são iguais (Tabela 3 e Gráfico 3). Observa-se

também, que não há influência da concentração na germinação da *I. grandifolia* e *E. heterophylla*, pois, para as duas espécies receptoras as concentrações de 200, 400 e 600 ppm também são consideradas iguais. Desta forma a única diferença significativa ocorre entre as espécies utilizadas, sendo a *E. heterophylla* a mais afetada, independente da concentração ou extrato utilizado, como citado anteriormente (Gráfico 3). Assim, devido a sua sensibilidade, a espécie *E. Heterophylla* pode ser recomendada para estudos de fitotoxicidade com extratos de plantas.

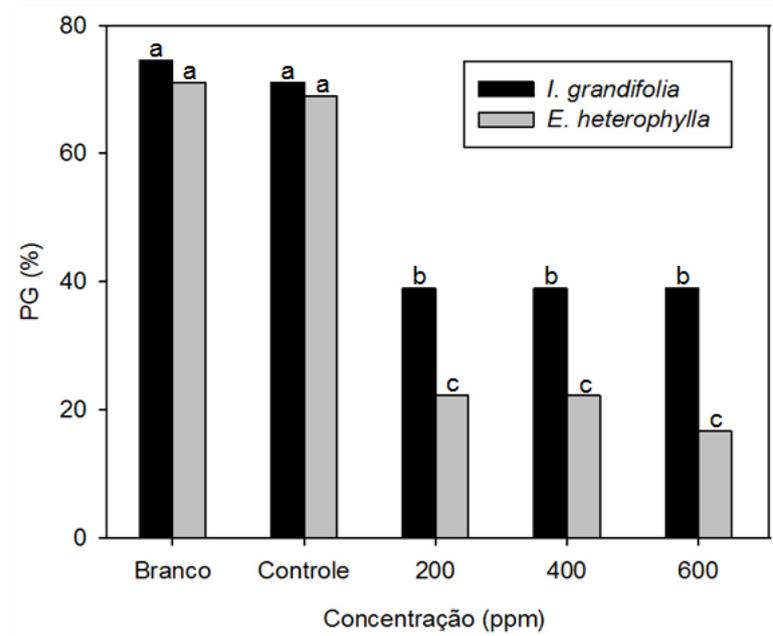


Gráfico 3 - Porcentagem de Germinação (PG) avaliando a interação Espécie vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O processo de germinação das sementes utilizadas no bioensaio foi avaliado cineticamente por meio do cálculo do TMG e VMG (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). A variável TMG apresentou interação significativa extrato vs. concentração, sendo o branco e o controle considerados iguais independente da espécie ou extrato aplicado (Tabela 3 e Gráfico 4). Desta forma os solventes (éter de petróleo, acetato de etila e metanol) não influenciaram no aumento do TMG, sendo este efeito realmente causado pelos compostos alelopáticos dos extratos utilizados.

De acordo com a análise estatística os extratos de éter de petróleo e acetato de etila, nas concentrações de 400 e 600 ppm, foram os que mais influenciaram no

aumento do TMG, de 1,24 dias para 4,52 dias, comparando-se com o branco, ou seja, um aumento de 264,5% (Gráfico 4), assim os aleloquímicos presentes nos extratos de éter de petróleo e acetato de etila praticamente triplicaram o TMG das duas espécies receptoras utilizadas neste estudo, destacando-se que quanto maior o TMG, maior será o período necessário para que um grupo de sementes germine.

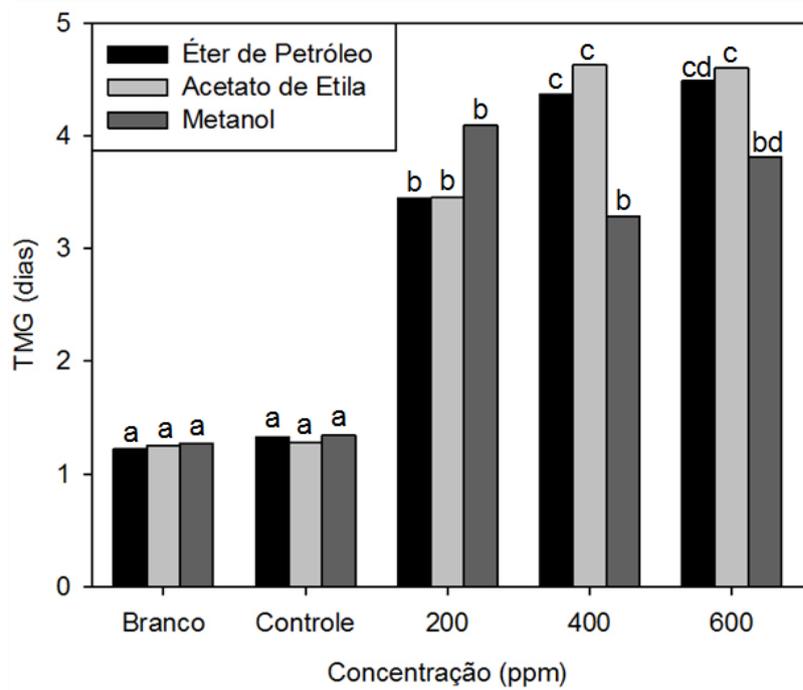


Gráfico 4 - Tempo Médio de Germinação (TMG) avaliando a interação Extrato vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A VMG caracteriza-se como o inverso do TMG, ou seja, ela expressa o número de sementes que são germinadas por dia (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Estatisticamente as médias da VMG das duas espécies receptoras utilizadas no bioensaio são iguais, mas houve uma interação significativa entre extrato vs. concentração (Tabela 3 e Gráfico 5). Esta interação demonstrou que os extratos de éter de petróleo e acetato de etila são estatisticamente iguais e que, independente da concentração, eles são os que mais contribuem para a diminuição da VMG, em média 66,7% menor quando comparada com o branco, passando de 0,81 sementes/dia para 0,27 sementes/dia. Esta diminuição é realmente causada pelos extratos, pois não houve diferença estatística significativa entre as médias do branco e controle (Gráfico 5).

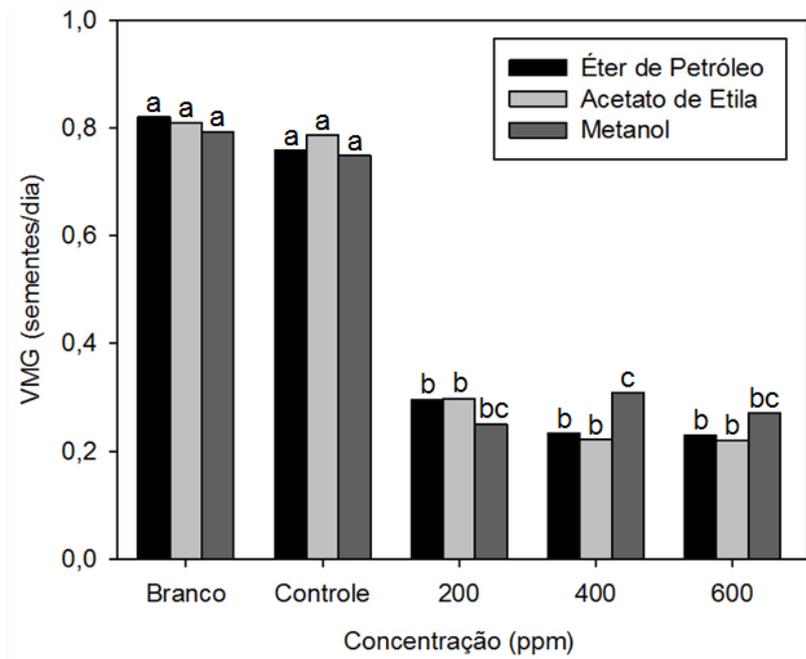


Gráfico 5 - Velocidade Média de Germinação (VMG) avaliando a interação Extrato vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Outro fator importante a ser considerado, é o fato dos extratos causarem deformidades e mortes nas plântulas que germinaram durante o bioensaio, influenciando assim no desenvolvimento destas. Estatisticamente foi avaliado a PPN, sendo que esta variável apresentou interação significativa entre espécie vs. extrato e espécie vs. concentração (Tabela 3). Assim, o tratamento que apresentou a menor PPN foi considerado o melhor, pois este foi o que causou mais deformidades e/ou mortes de plântulas.

Analisando a interação espécie vs. extrato, pode-se dizer que a espécie receptora *E. heterophylla* foi mais prejudicada do que a espécie *I. grandyphollia*, destacando-se os extratos de acetato de etila e metanol, considerados estatisticamente iguais e com média de 67,7% de plântulas com deformidades e/ou mortas (Gráfico 6). Para a interação espécie vs. concentração, o melhor resultado foi obtido com a concentração de 600 ppm, independente do extrato aplicado, e a espécie receptora mais sensível também foi a *E. heterophylla*, resultando em uma média de 96,7% de plântulas com deformidades e/ou mortas. Sendo que estes efeitos prejudiciais não foram causados pelos solventes utilizados, pois as médias do branco e do controle foram consideradas estatisticamente iguais (Gráfico 7).

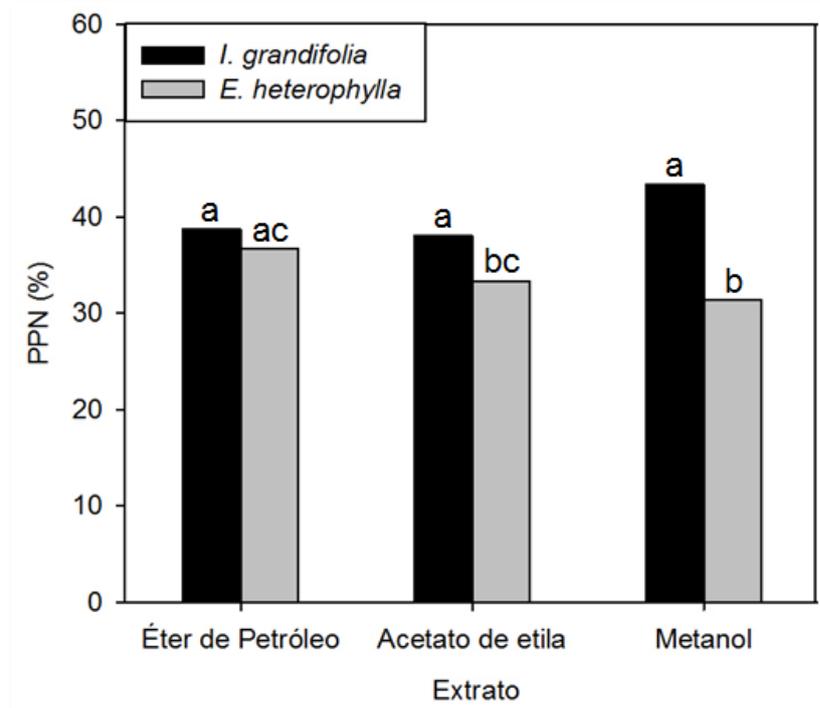


Gráfico 6 - Porcentagem de Plântulas Normais (PPN) avaliando a interação Espécie vs. Extrato. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

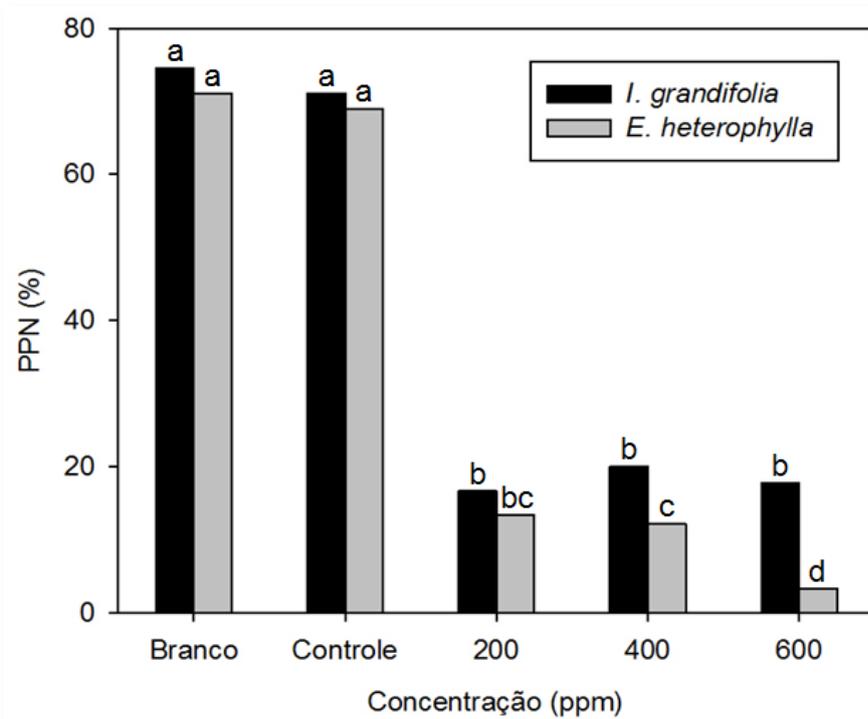


Gráfico 7 - Porcentagem de Plântulas Normais (PPN) avaliando a interação Espécie vs. Concentração. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Através deste bioensaio pode-se constatar que os extratos de éter de petróleo e acetato de etila, independente da concentração utilizada, afetam principalmente a cinética do processo de germinação, isto igualmente para as duas espécies receptoras empregadas neste estudo. Quanto a inibição da germinação a espécie receptora *E. heterophylla*, se demonstrou mais suscetível que a *I. grandyphollia*, principalmente frente ao extrato de metanol, independente da concentração utilizada. O extrato de metanol também foi o que mais causou deformidades e/ou mortes de plântulas, sendo novamente a espécie *E. heterophylla* a mais afetada.

As diferenças de sensibilidade entre espécies receptoras são comuns em estudos alelopáticos, isto devido aos diferentes mecanismos de absorção, translocação e sítio ativo dos compostos alelopáticos presentes nos órgãos e tecidos vegetais destas, podendo esta sensibilidade ser alterada de acordo com a concentração destes compostos alelopáticos, condições ambientais e estadio de desenvolvimento da planta (WEIR et al., 2004).

As alterações que ocorrem nos processos germinativos indicam mudanças nas rotas metabólicas, alterando assim o processo de desenvolvimento do embrião da espécie receptora (FERREIRA; ÁQUILA, 2000), resultando em mudanças na permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do DNA, respiração celular etc. (FERREIRA; BORGUETTI, 2004). Para que os compostos alelopáticos sejam efetivos nas espécies receptoras, é preciso que estes sejam absorvidos em concentrações aceitáveis para atuarem sobre o metabolismo destas.

Assim, a germinação da espécie receptora *I. grandifolia* pode ter sido menos comprometida, em relação a *E. heterophylla*, devido as suas características rústicas, sendo ela conhecida por sua tolerância à alguns herbicidas, dentre eles o glifosato (MONQUERO et al., 2004; RAMIRES et al., 2010).

5.4.4 Bioensaio de Crescimento de Radícula e Hipocótilo

O bioensaio foi realizado em triplicata, utilizando as soluções dos extratos brutos nas concentrações de 200, 400 e 600 ppm e branco e controle, sendo que foi adicionado em cada placa de petri 5 mL destas (Figura 26), e a partir de então apenas 1 mL de água destilada a cada 24 horas.

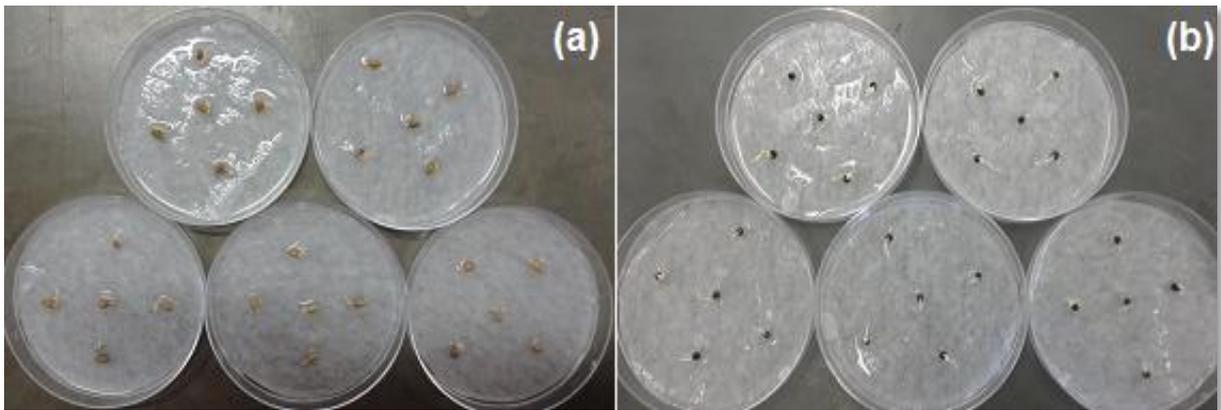


Figura 26 - Início do teste de crescimento, (a) sementes pré-germinadas de *I. grandifolia* e (b) sementes pré-germinadas de *E. heterophylla*.

O alongamento da radícula e do hipocótilo das duas espécies receptoras foram monitorados durante 8 dias, sendo estes medidos diariamente, e no oitavo dia realizou-se a contagem de plântulas mortas (PM) (Figura 27).

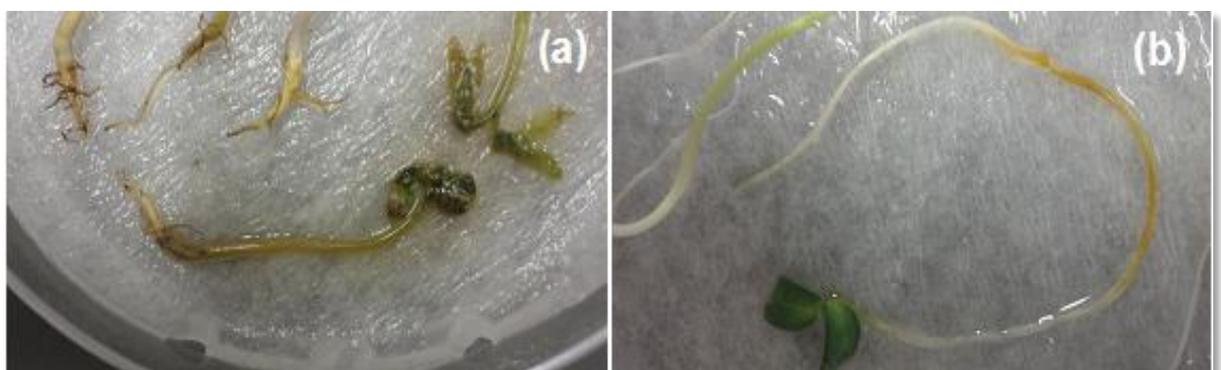


Figura 27 - Exemplos de plântulas mortas: (a) *I. grandifolia* e (b) *E. heterophylla*.

Os resultados podem ser observados nos quadros 8 e 9.

Quadro 8 - Resultados do 8^o dia de experimento das variáveis Comprimento da Radícula, Comprimento do Hipocótilo e Plântulas Mortas (PM%) para a espécie receptora *I. grandifolia*.

Espécie Receptora	Extratos Brutos	Concentrações (ppm)	Comprimento da Radícula (mm)	Comprimento do Hipocótilo (mm)	Plântulas Mortas (%)
Corda de Viola (<i>Ipomoea grandifolia</i>)	Éter de Petróleo	Branco	48,07	67,34	0,0
		Controle	47,19	66,97	0,0
		200	25,46	29,91	73,3
		400	31,00	25,51	40,0
		600	16,48	20,93	73,3
	Acetato de Etila	Branco	54,37	71,13	0,0
		Controle	54,83	75,11	0,0
		200	22,07	38,18	53,3
		400	18,36	32,42	33,3
		600	16,41	36,81	66,7
	Metanol	Branco	54,61	67,37	0,0
		Controle	49,56	67,00	0,0
		200	36,30	37,74	53,3
		400	35,66	32,72	53,3
		600	22,24	32,53	46,7

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas.

Quadro 9 - Resultados do 8^o dia de experimento das variáveis Comprimento da Radícula, Comprimento do Hipocótilo e Plântulas Mortas (PM%) para a espécie receptora *E. heterophylla*.

Espécie Receptora	Extrato Bruto	Concentrações (ppm)	Comprimento da Radícula (mm)	Comprimento do Hipocótilo (mm)	Plântulas Mortas (%)
<i>Leiteira (Euphorbia heterophylla)</i>	Éter de Petróleo	Branco	52,20	64,18	0,0
		Controle	49,81	68,51	0,0
		200	36,08	35,96	73,3
		400	29,52	27,29	40,0
		600	46,55	41,69	73,3
	Acetato de Etila	Branco	52,34	71,29	0,0
		Controle	76,42	80,04	0,0
		200	21,95	40,13	46,7
		400	18,51	37,88	46,7
		600	16,72	18,59	66,7
	Metanol	Branco	48,39	63,96	0,0
		Controle	47,5	67,98	0,0
		200	37,20	52,41	53,33
		400	37,28	51,68	26,67
		600	41,20	37,52	53,33

Obs: Os dados apresentados são as médias dos valores das triplicatas.

Os dados em destaque nos quadros 5 e 6 representam qualitativamente os melhores resultados dentre todos os extratos para as três variáveis avaliadas com as espécies receptoras *I. grandifolia* e *E. heterophylla*, respectivamente.

Estatisticamente as variáveis Comprimento de Radícula e Hipocótilo apresentaram interação tripla significativa entre os tratamentos avaliados, espécie receptora vs. extrato vs. concentração, aliada a falta de normalidade. Assim, optou-se por analisar o efeito dos extratos e concentrações isoladamente dentro de cada espécie receptora (Tabela 4 e 5), facilitando a interpretação estatística e tornando os dados normais sem necessidade de transformação.

Tabela 4 - Resumo da ANOVA para as variáveis Comprimento de Radícula, Hipocótilo e Porcentagem de Plântulas Mortas (PM) para o 8º dia do bioensaio em *I. grandifolia*.

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio (QM)		
		Comprimento da Radícula	Comprimento do Hipocótilo	PM ^b
Extrato (B)	2	196,03**	282,90**	0,828 ^{ns}
Concentração (C)	4	2050,71**	3795,40**	111,14**
B x C	8	82,67**	28,80*	1,358 ^{ns}
Resíduo	30	7,680	10,30	0,972
CV(%)		7,800	6,850	20,52

^b estimados a partir de dados transformados por $\sqrt{(x + 1)}$.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e ^{ns} $p > 0,05$ pelo teste F.

Tabela 5 - Resumo da ANOVA para as variáveis Comprimento de Radícula, Hipocótilo e Porcentagem de Plântulas Mortas (PM) para o 8º dia do bioensaio em *E. heterophylla*.

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio (QM)		
		Comprimento da Radícula	Comprimento do Hipocótilo	PM ^b
Extrato (B)	2	146,01**	204,10**	2,219 ^{ns}
Concentração (C)	4	1500,5**	2787,28**	105,14**
B x C	8	471,53**	277,15**	0,979 ^{ns}
Resíduo	30	14,50	23,10	1,853
CV(%)		9,340	9,50	28,9

^b estimados a partir de dados transformados por $\sqrt{(x + 1)}$.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e ^{ns} $p > 0,05$ pelo teste F.

Para a espécie receptora *I. grandifolia* a variável Comprimento da Radícula apresentou diferença estatística significativa para os extratos, concentração e para a interação extrato vs. concentração (Tabela 4). Assim, para a interação extrato vs. concentração, observa-se que ao final do oitavo dia de experimento, os extratos mais efetivos sobre a inibição do crescimento da radícula foram o de éter de petróleo a 600 ppm e acetato de etila em todas as concentrações, sendo estes tratamentos considerados estatisticamente iguais (Gráfico 8). Estes, reduziram em média a radícula das plântulas de 54,37mm para 18,33mm, uma diminuição de 66,3% do comprimento, quando comparado com o branco do tratamento com acetato de etila. Esta interação extrato vs. concentração, prova que para os extratos de éter de petróleo e acetato de etila o efeito alelopático sobre a radícula é realmente por parte dos aleloquímicos presentes nos extratos aplicados, já que estatisticamente as médias do branco e do controle são iguais (Gráfico 8).

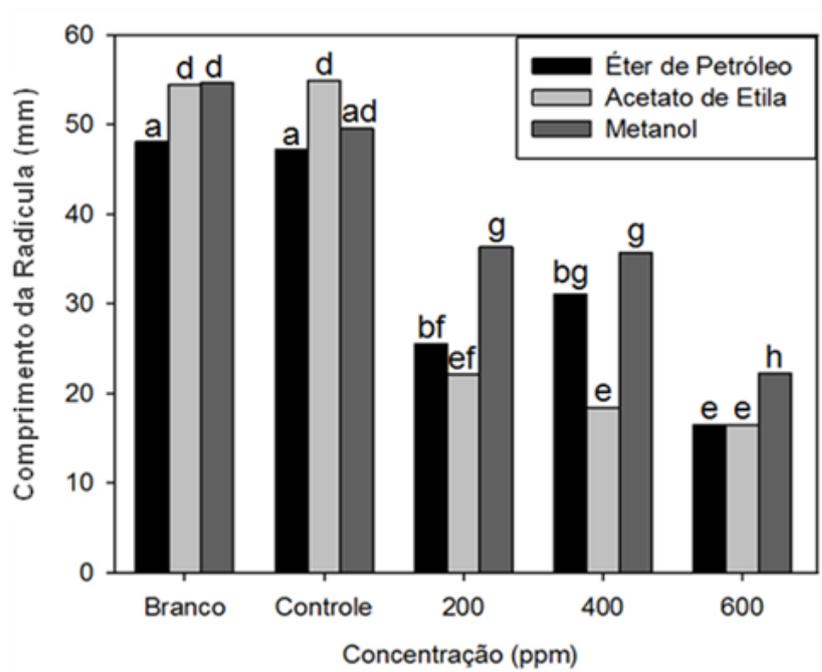


Gráfico 8 - Comprimento da Radícula (mm) avaliando a Interação Extrato vs. Concentração para a *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A variável para a medida do hipocótilo também apresentou diferença estatística significativa para os extratos, concentração e para a interação extrato vs. concentração (Tabela 4). Deste modo, o extrato mais eficaz sobre a inibição do crescimento do hipocótilo foi o de éter de petróleo a 400 e 600 ppm, sendo as duas

concentrações consideradas iguais estatisticamente (Gráfico 9). O hipocótilo teve uma diminuição em média de 65,5%, passando de 67,34mm para 23,22mm, quando comparado com o branco.

Da mesma forma que para o comprimento da radícula, a redução do comprimento do hipocótilo também ocorreu devido a ação dos compostos alelopáticos, não havendo interferência dos solventes de éter de petróleo e metanol utilizados no preparo dos extratos de *E. plana* Nees, pois as médias do branco e do controle foram consideradas estatisticamente iguais, a não ser por uma pequena discrepância no controle de acetato de etila (Gráfico 9).

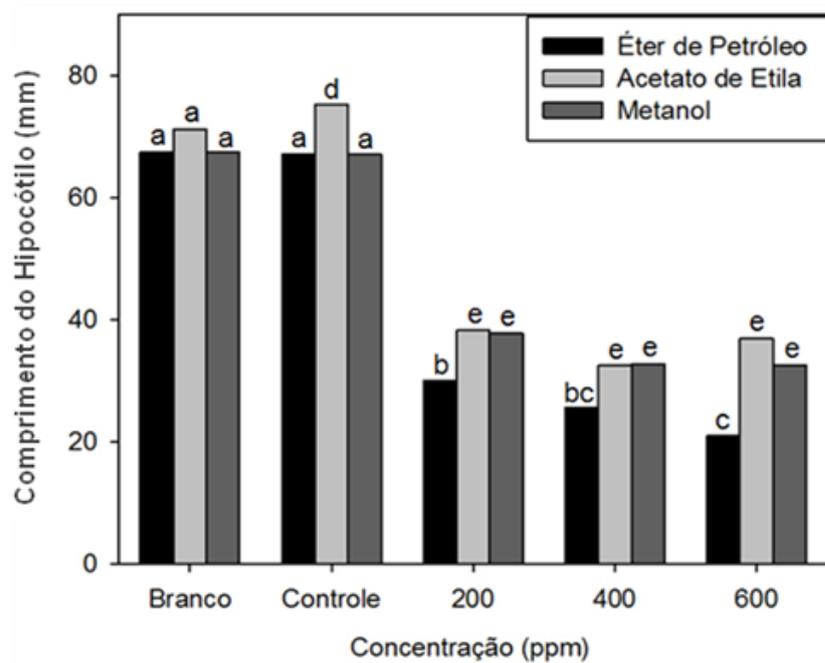


Gráfico 9 - Comprimento do Hipocótilo (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Para este bioensaio também avaliou-se a mortalidade das plântulas, devido a toxicidade dos aleloquímicos presentes nos extratos de *E. plana* Nees, por meio do cálculo de PM. Esta variável apresentou diferença estatística a nível de concentração, sendo o branco e o controle considerados iguais independente do extrato aplicado (Tabela 4 e Gráfico 10). Desta forma os solventes não influenciaram na mortalidade das plântulas, sendo este efeito realmente causado pelos compostos alelopáticos dos extratos utilizados.

De acordo com a análise estatística as concentrações de 200 e 600 ppm, consideradas estatisticamente iguais e independente do extrato aplicado, são as mais tóxicas causando em média a morte de 61,1% das plântulas, comparado ao branco que não causou a mortalidade de nenhuma plântula (Gráfico 10), destacando-se que mesmo que uma plântula se desenvolva há a probabilidade desta morrer.

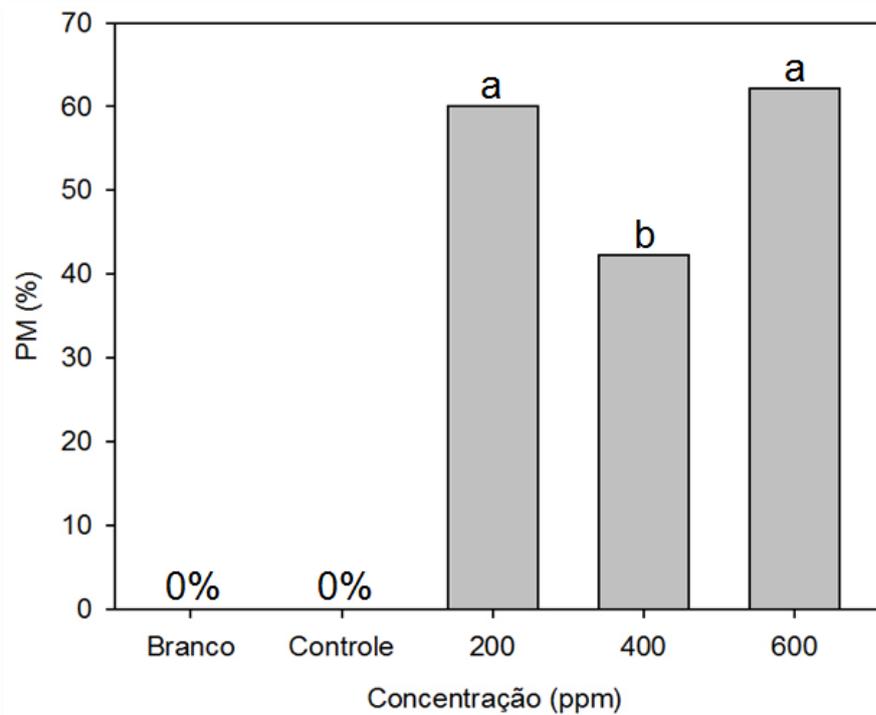


Gráfico 10 - Variável PM (%) a nível de concentração para *I. grandifolia*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A espécie receptora *E. heterophylla* seguiu o mesmo padrão apresentado pela *I. grandifolia*, com diferença estatística significativa entre as médias a nível de extrato, concentração e interação extrato vs. concentração, para as variáveis Comprimento de Radícula e Hipocótilo, e diferença quanto a concentração para a variável PM (Tabela 5).

Para a variável Comprimento da Radícula, observa-se no 8º dia de bioensaio, que o extrato que mais inibiu o seu crescimento foi o de acetato de etila em todas as concentrações, já que elas foram consideradas estatisticamente iguais (Gráfico 11). O extrato de acetato de etila reduziu em média 63,6% do comprimento da radícula, passando de 52,34mm para 19,06mm, em comparação ao seu branco.

Através da interação extrato vs. concentração, pode-se afirmar que para os extratos de éter de petróleo e metanol, a diminuição da radícula ocorre por parte dos compostos alelopáticos presentes nestes, pois a média do branco e do controle são estatisticamente iguais, menos para o controle de acetato de etila, porém ainda que haja alguma interferência por parte do solvente, o efeito alelopático se deve principalmente a ação dos aleloquímicos extraídos da *E. plana* Nees (Gráfico 11).

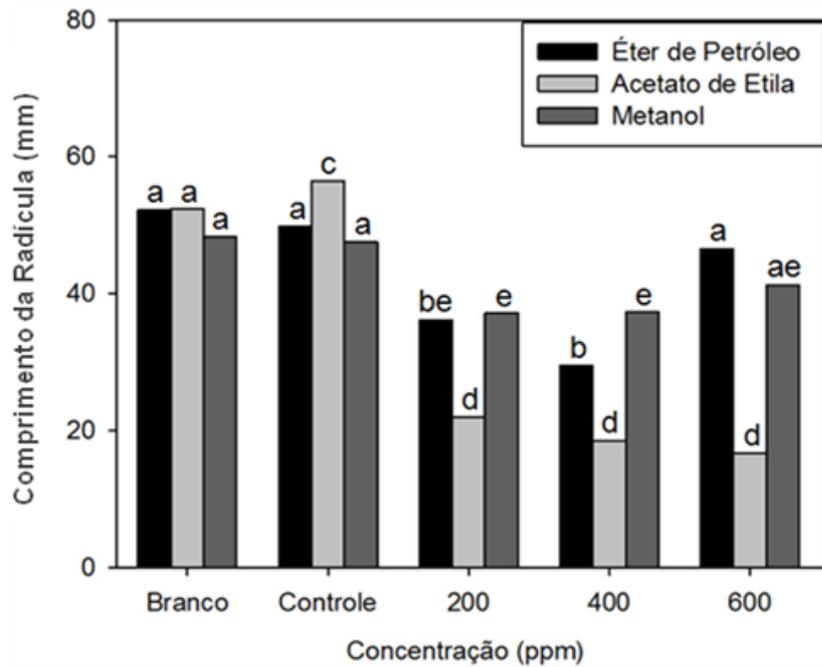


Gráfico 11 - Comprimento da Radícula (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Para a variável Comprimento do Hipocótilo, o extrato que causou a sua maior inibição foi o de acetato de etila a 600 ppm (Gráfico 12). O hipocótilo apresentou em média uma redução de 66,48mm para 18,59mm, ou seja, 72% a menos que a média do branco. Igualmente a variável Radícula, a inibição do crescimento do hipocótilo aconteceu por parte dos aleloquímicos presentes nos extratos, não ocorrendo intervenção dos solventes neste efeito alelopático, com exceção do controle de acetato de etila que apresentou uma pequena variação (Gráfico 12).

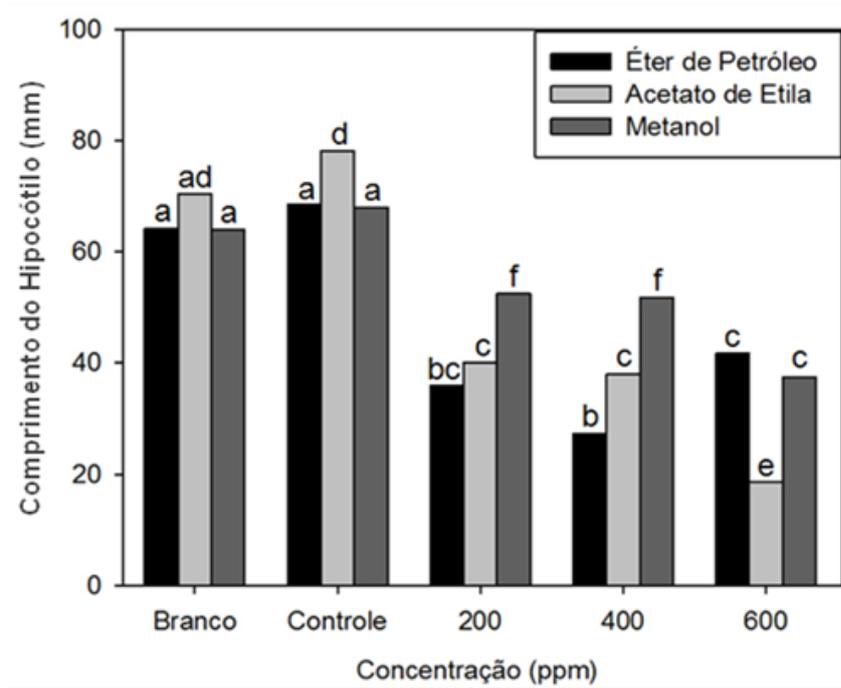


Gráfico 12 - Comprimento do Hipocótilo (mm) avaliando a interação Extrato vs. Concentração para a *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Quanto à mortalidade das plântulas representada pela variável PM, a análise estatística mostrou o mesmo resultado observado para a espécie receptora *I. grandifolia*, onde as concentrações de 200 e 600 ppm, consideradas iguais e independentemente do extrato aplicado, são as mais tóxicas ocasionando em média 59,6% de mortes de plântulas, quando comparado com branco que não causou a morte de nenhuma plântula (Gráfico 13).

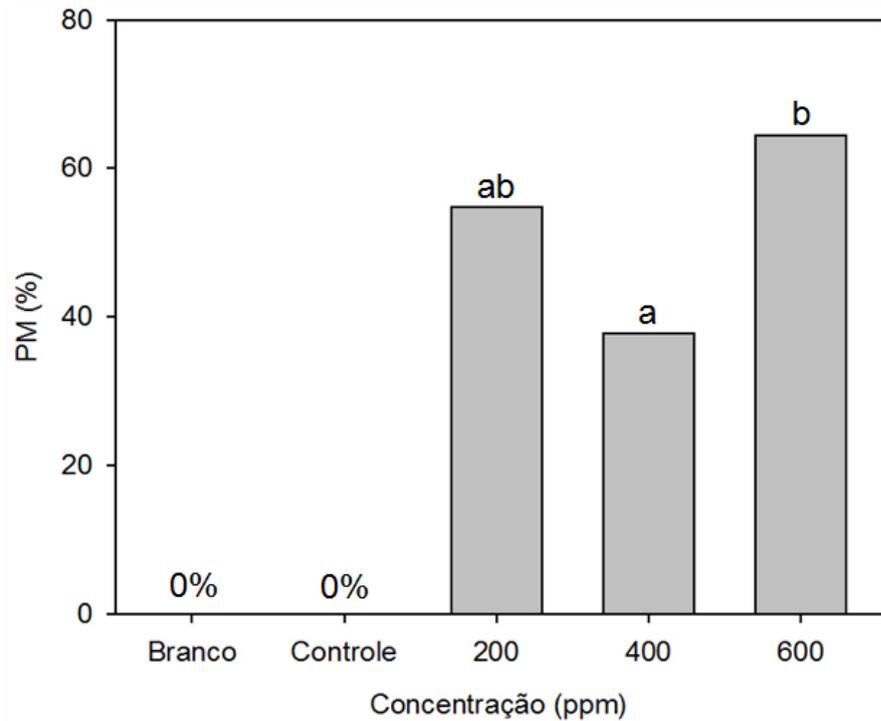


Gráfico 13 - Variável PM (%) a nível de concentração para *E. heterophylla*. As colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Através deste bioensaio pode-se constatar que o extrato de metanol é o que menos afeta as variáveis Radícula, Hipocótilo e PM, isto para ambas as espécies receptoras escolhidas para este estudo, sendo este resultado o oposto do que foi observado para o bioensaio de germinação, já que para este o extrato de metanol foi o que apresentou o melhor resultado quanto a inibição da germinação de sementes.

Mesmo para os tratamentos menos eficazes contra a inibição da radícula e do hipocótilo, qualquer diminuição é favorável, pois estas reduções prejudicam a capacidade de competição das plantas daninhas, auxiliando desta forma o desenvolvimento das plantas de interesse econômico (SOUZA FILHO et al., 1997).

No decorrer de todos os bioensaios verificou-se a ocorrência de diversas anomalias nas sementes e plântulas das espécies receptoras *I. grandifolia* e *E. heterophylla*, em comparação com os seus Brancos tratados apenas com água destilada. Assim observaram-se danificações nas raízes primárias, que se desenvolveram menos e de forma mais fina, apresentando posteriormente oxidação da coifa (necrose da radícula) (Figura 28 (a) e (d)), indicando desta forma a ação de compostos tóxicos presentes nos extratos de *E. plana* Nees. Algumas plântulas também não desenvolveram raízes laterais, o contrário do apresentado pelas

tratadas apenas com água destilada. Os hipocótilos de ambas as espécies receptoras utilizadas neste estudo foram afetados, também apresentando oxidação (Figura 28 (b), (c) e (d)), isto posteriormente a oxidação da coifa. Também foi observada uma redução no desenvolvimento das folhas das plântulas, principalmente para a espécie receptora *E. heterophylla*, além de ocorrer oxidação (Figura 28 (b) e (e)), da mesma forma que para a radícula e hipocótilo.

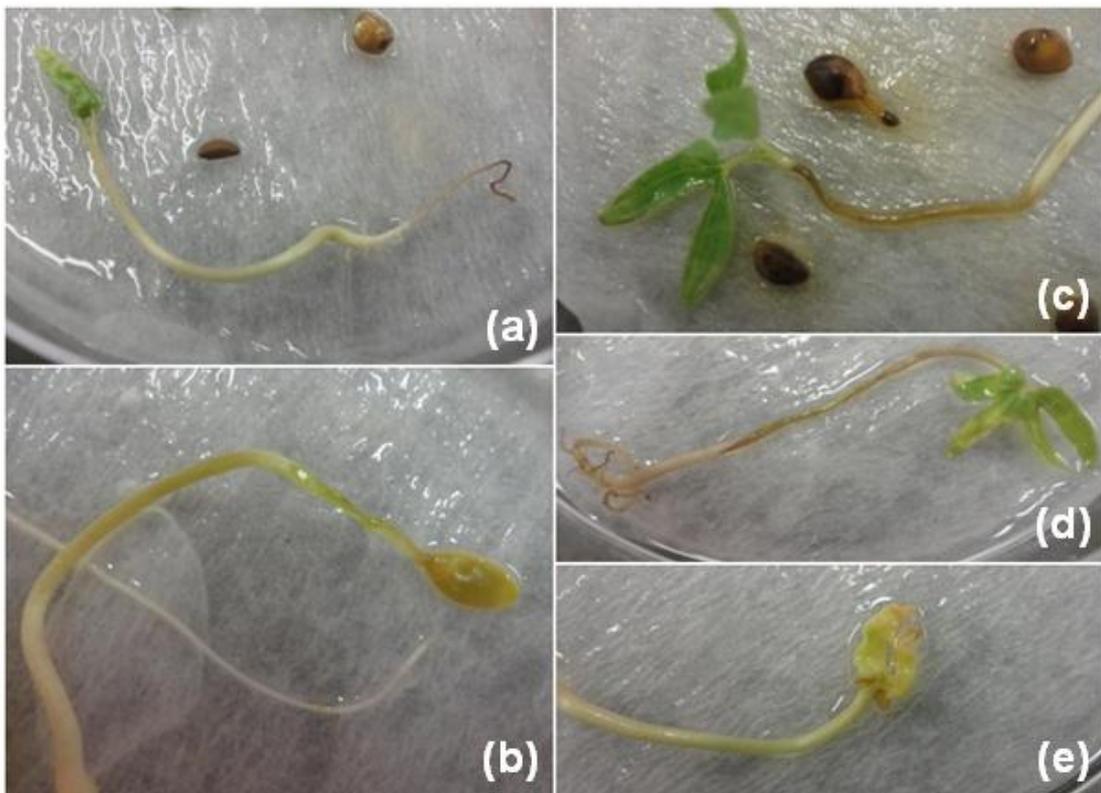


Figura 28 - Exemplos da anomalias ocorridas durante os bioensaios: (a) oxidação (necrose) da radícula, (b) mal desenvolvimento das folhas, (c) oxidação do hipocótilo, (d) oxidação da radícula e hipocótilo e (e) oxidação das folhas.

A interferência no desenvolvimento da radícula, é um dos principais indicadores do efeito alelopático apresentados por extratos de plantas. Isto devido ao fato do contato direto das raízes com as substâncias alelopáticas presentes nos extratos em estudo, facilitando assim a absorção e ação destas durante a fase inicial de desenvolvimento, interferindo desta forma diretamente na divisão celular das plântulas, prejudicando o seu desenvolvimento (SOUZA FILHO et al., 1997; FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

De acordo com Rice (1984) as substâncias mais polares, dentre elas os compostos fenólicos, correspondem a uma parcela de produtos naturais onde se

encontram a maioria das substâncias com potenciais alelopáticos, estando esta declaração de acordo com os resultados obtidos neste estudo, sendo que o extrato de metanol foi o que mais inibiu a germinação da espécie receptora *E. heterophylla*, esta a mais afetada no bioensaio de germinação.

Na literatura encontraram-se poucos estudos referentes ao potencial alelopático do Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees). O mais relevante obtive como resultado a partir de extratos aquosos de *E. plana* Nees uma inibição na germinação de aveia preta (*Avena strigosa*) em 49,1% (extrato bruto de folhas + raízes) (PERTILE, 2014).

5.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram fracionados e purificados através de cromatografia em coluna (CC) (Figura 29 (a), (b), (c), (d) e (e)), cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 29 (f) e (g)) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como reveladores câmara de iodo ressublimado e radiação de luz ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 365 nm (Figura 29 (f) e (g)).

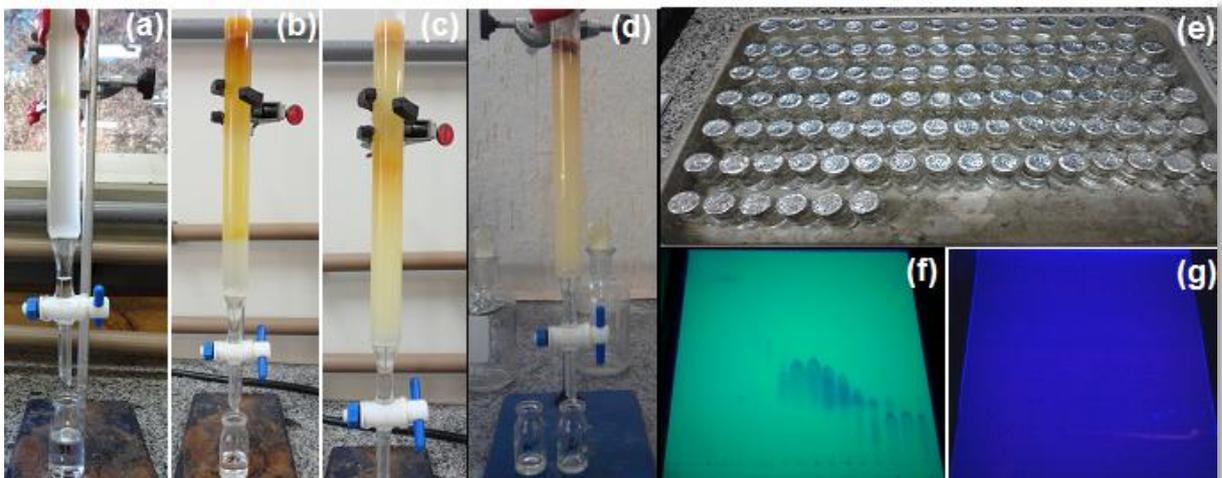


Figura 29 - (a) Fracionamento do extrato de éter de petróleo, (b) e (c) acetato de etila e (d) metanol, (e) frações obtidas do extrato de éter de petróleo, (f) e (g) revelação da CCD por UV no comprimento de onda 254 e 365 nm, respectivamente.

5.5.1 Substâncias Identificadas do Extrato Bruto de Éter de Petróleo

A amostra RVE - 2 (5 mg), proveniente da fração E4, de aspecto oleoso (amarelo), inicialmente foi submetida à análise por RMN¹H, sendo as absorções observadas (Figura 31) semelhantes as apresentadas pela substância 3,20-di-hidroxi-*ent*-1(10) 15-rosadieno (Figura 30 e Tabela 6) (WANG, 2013).

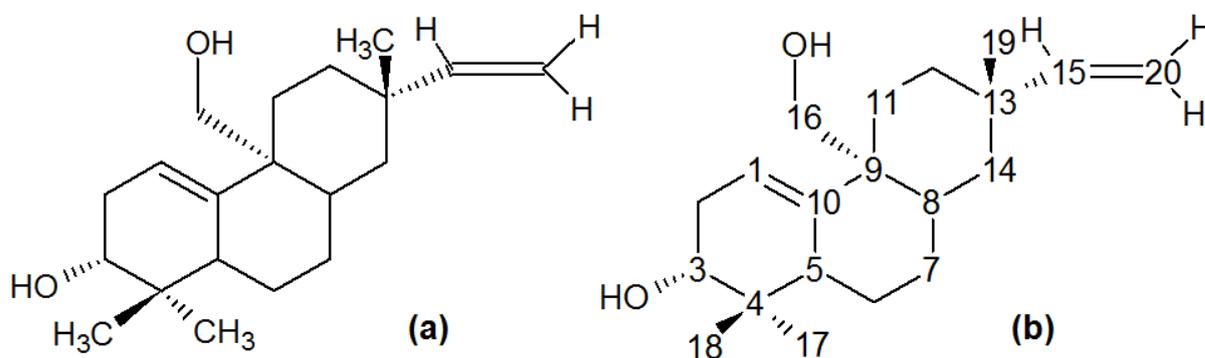


Figura 30 - (a) Estrutura da 3,20-di-hidroxi-*ent*-1(10) 15-rosadieno e (b) Numeração dos carbonos.

Tabela 6 - Comparação das absorções experimentais com dados da literatura.

(continua)

Posição	RMN ¹ RVE - 2 ÉTER - 1	RMN ¹ Literatura	RMN ¹ RVE - 2 ÉTER - 2
1	6,07 (1H, dd)	5,48 (1 H, t)	5,44 (1H, d)
2	2,34 (1H, dddd), 2,01 (1H, m)	2,37 (1H, dddd), 1,96 (1H, m)	5,33 (1H, dd)
3	3,05 (1H, s largo)	3,52 (1H, dd)	5,05 (1H, dd)
5	2,11 (1H, m)	2,20 (1H, m)	2,11 (1H, m)
6	1,33 (1H, m), 1,77 (1H, m)	1,75 (1H, m), 1,31 (1H, m)	1,33 (1H, m), 1,77 (1H, m)
7	1,60 (1H, m), 1,26 (1H, m)	1,65 (1H, m), 1,26 (1H, m)	1,60 (1H, m), 1,26 (1H, m)

(conclusão)

8	1,99 (1H, m)	1,92 (1H, m)	2,00 (1H, m)
11	2,09 (1H, m), 1,24 (1H, m)	2,09 (1H, m), 1,22 (1H, m)	2,09 (1H, m), 1,24 (1H, m)
12	1,43 (1H, m), 1,29 (1H, m)	1,55 (1H, m), 1,27 (1H, m)	1,43 (1H, m), 1,29 (1H, m)
14	0,94 (1H, m), 0,85 (1H, m)	1,21 (1H, m), 1,19 (1H, m)	0,94 (1H, m), 0,85 (1H, m)
15	5,82 (1H, dd)	5,82 (1H, dd)	5,82 (1H, dd)
16	5,05 (1H, dd), 5,33 (1H, dd)	4,91 (1H, dd), 4,85 (1H, dd)	5,05 (1H, dd), 5,33 (1H, dd)
17	1,05 (3H, s)	1,1 (3H, s)	1,05 (3H, s)
18	1,07(3H, s)	1,03 (3H, s)	1,07(3H, s)
19	1,02 (3H, s)	0,68 (3H, s)	1,02 (3H, s)
20	4,71 (1H, d), 3,66 (1H, d)	3,80 (1H, d), 3,28 (1H, d)	4,71 (1H, d), 3,66 (1H, d)

Fonte: WANG, 2013.

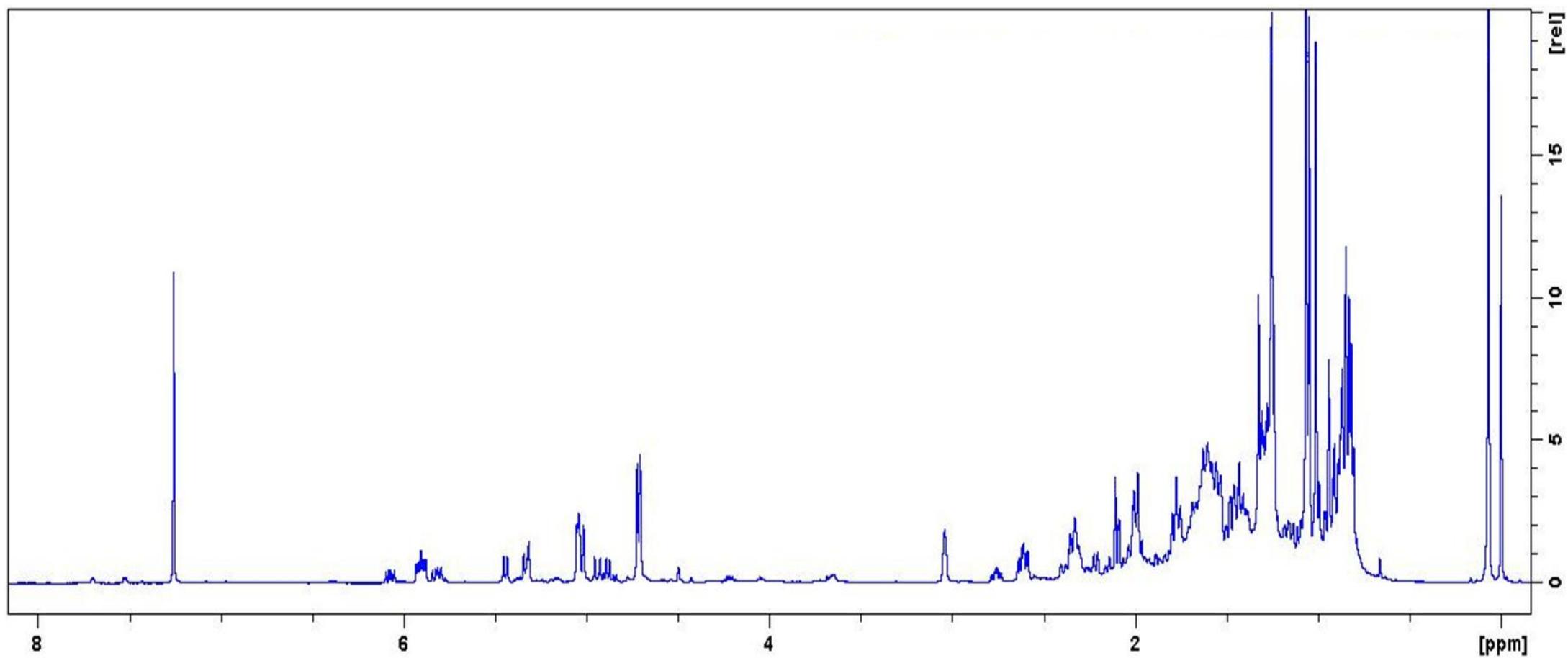


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da amostra RVE - 2.

Observa-se discrepância apenas no sinal do H-1, segundo a literatura, δ 5,48 (1 H; t) e, no espectro de RMN ^1H obtido da substância RVE-2, δ 6,07 (1H, dd), observando-se a estrutura da substância proposta, na figura 33, observa-se que o H-1 acopla com dois átomos de hidrogênio na posição 2 (δ 2,37, δ 1,99), pertencentes a um anel de seis membros e, que portanto podem assumir as posições pseudo axial e pseudo equatorial, originando um duplo duplete. Portanto a amostra RVE-2 está sendo proposta como sendo a 3,20-di-hidroxi-*ent*-1(10) 15-rosadieno, um diterpeno de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$.

5.5.4 Estrutura Proposta para Substância Isolada do Extrato de Metanol

Através da fração M5 (14 mg) do extrato bruto de metanol, foi obtido a substância METANOL - 1 (14 mg), sendo sua estrutura proposta baseada em dados de RMN ^1H relatados na literatura (ANDREI, 2002), para a rotenona (Figura 32). Esta substância ainda está em análise, aguardando os dados espectrais de RMN ^{13}C , além de bidimensionais.

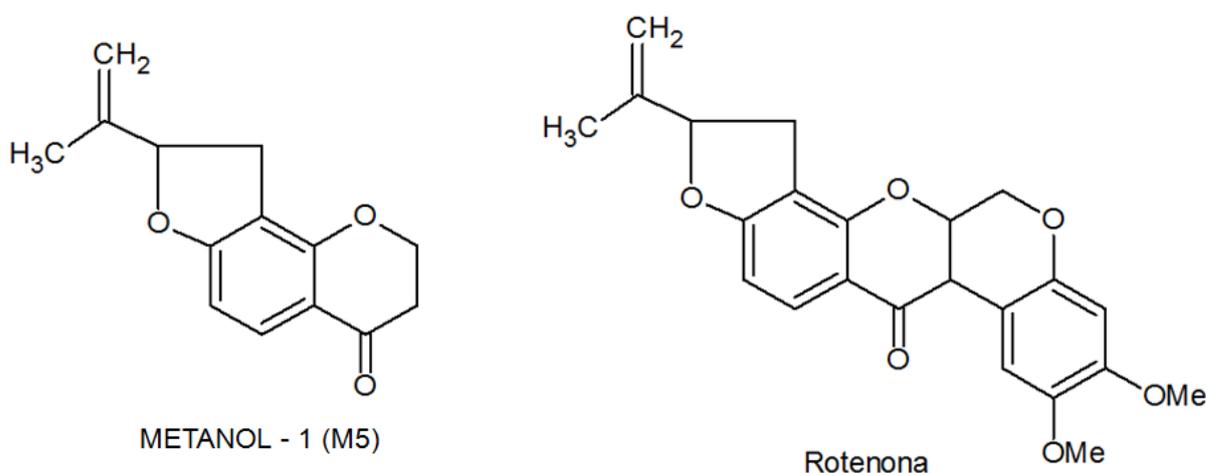


Figura 32 - Comparação da estrutura proposta para METANOL - 1 com a rotenona.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No estudo do potencial alelopático da *E. plana* Nees, constatou-se que os extratos brutos de éter de petróleo e acetato de etila afetam principalmente a cinética do processo de germinação, retardando o início da germinação e diminuindo o número de sementes germinadas por dia. Quanto a inibição da germinação o extrato bruto de metanol foi o que se apresentou mais eficaz, sendo que este também foi o que mais causou deformidades e/ou mortes de plântulas. Entre as duas espécies receptoras utilizadas a *E. heterophylla* foi mais afetada que a *I. grandifolia*, sendo desta forma mais suscetível aos aleloquímicos presentes na *E. plana* Nees. Quanto a avaliação da inibição do crescimento da radícula e hipocótilo, o oposto foi observado, sendo o extrato bruto de metanol o que menos afetou estas duas variáveis. Devido a sua sensibilidade a espécie *E. heterophylla* pode ser recomendada para estudos de fitotoxicidade de extratos de plantas.

Até o presente momento, por meio do estudo fitoquímico da *E. plana* Nees, foi proposta a estrutura de duas substâncias presentes em suas raízes, um diterpeno e um rotenoide. Este estudo continuará e as substâncias que já foram isoladas, terão suas estruturas elucidadas.

Esta dissertação faz parte de um estudo com o Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees), que vem sendo realizado em parceria com o prof. Dr. Michelângelo M. Trezzi (Departamento de Agronomia – UTFPR – câmpus Pato Branco). Estudo este que aborda os aspectos fitoquímicos associados às propriedades alelopáticas das folhas e raízes dessa planta, coletadas no inverno e no verão. Portanto, os resultados que nesta dissertação foram apresentados como preliminares, continuarão a serem desenvolvidos e apresentados subsequentemente. E, mais ainda, faz parte da proposta de estudo, a realização de testes alelopáticos utilizando as substâncias puras, identificadas e que forem obtidas em quantidades suficientes.

REFERÊNCIAS

ALFAYA, H.; SUÑÉ, L. N. P.; SIQUEIRA, C. M. G.; SILVA, D. J. S.; SILVA, J. B.; PEDERZOLLI, E. M.; LÜEDER, W. E. Efeito da amonização com uréia sobre os parâmetros de qualidade do feno do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 842-851, 2002.

ALMEIDA, L. F. R. **Composição química e atividade alelopática de extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. 2006. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

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

ANDRADE, A. C. S.; SOUZA, A. F.; RAMOS, F. N.; PEREIRA, T. S.; CRUZ, A. P. M. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.

ANDREI, C. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; FO, E. R. New Spirorotenoids from *Tephrosia candida*. **Z. Naturforsch**, v. 57, p. 418-422, 2002.

ARRUDA, M. S. P.; MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E. Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 392-396, 2006.

BARBOSA, F.; G., PILLAR, V. D.; PALMER, A. R.; MELO, A. S. Predicting the current distribution and potential spread of the exotic grass *Eragrostis plana* Nees in South America and identifying a bioclimatic niche shift during invasion. **Austral Ecology**: doi:10.1111/j.1442-9993. Ecological Society of Australia, 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa da Agropecuária, p. 358, 1992.

CARLOTTO, S. B.; MEDEIROS, R. B.; PELLEGRINI, C. B.; GARCIA, R. P. A.; LISBOA, C. A. V.; SAIBRO, J. C. Comportamento ingestivo diurno de vacas primíparas em pastagem nativa dominada por capim-annoni-2 com suplementação proteica e mineral em diversas estações climáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 39, n. 3, p. 454-461, 2010.

CAVALHEIRO, A. J.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CHON, S. U.; KIM, J. D. Biological activity and quantification of suspected allelochemicals from alfalfa plants parts. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 188, n. 4, p. 281-285, 2002.

CHON, S. U.; NELSON, C. J. Allelopathy in Compositae plants. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 349-358, 2010.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 108-111, 2011.

DALBOSCO, T. **Avaliação do potencial alelopático dos extratos foliares brutos do Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e estudo do óleo essencial**. 2013 105 p. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

DA SILVA, Henrique, L. **Potencial alelopático da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.)**. 2009. 104 p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; CHINELATTO JUNIOR, L. S.; REIS, C.; SILVA, A. A. Sorção e persistência da sorgoleona em um latossolo vermelho-amarelo. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 451-455, 2005.

FERNANDES, L. A. V.; MIRANDA, D. L. C.; SAQUETTA, C. R. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (BERT) Kuntze. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 139-146, 2007.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 2, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Interferência: Competição e Alelopatia. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 252 - 253, 2004.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs package. **R package version**, v. 1, n. 2, 2013

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B.; SOARES, G. L.G. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 043-050, 2008.

FOCHT, T. **Ecologia e dinâmica do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), uma invasora dos campos sulinos: prevenção da sua expansão**. 2008. 145 p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2009.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; PEREZ, N.B.; KALSING, A. Controle de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) com herbicidas pré-emergentes em associação com diferentes métodos de manejo do campo nativo. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 181-190, 2009.

HEISEY, R. M.; HEISEY, T. K. Herbicidal effects under field conditions of *Ailanthus altissima* bark extract which contains ailanthone. **Plant Soil**, v. 83, n. 2, p. 85-99, 2003.

HIERRO, J. L.; CALLAWAY, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, p. 29-39, 2003.

INOUE M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010.

JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physiology plant**, v. 29, p. 264-268, 1976.

KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential of *Pueraria thunbergiana*. **Bilogia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 471-473, 2003.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, p. 174, 1983.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P.; SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (LEGUMINOSAE), **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LUZ, S. M.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILOHN, G. M. S. P.; VILHENA, K. S. S. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 479-487, 2010.

MAESTRI, M.; ALVIM, P. T.; SILVA, M. A. P.; MOSQUIN, P. R.; PUSHMANN, R. CANO, M. A. O.; BARROS, R. S. **Fisiologia Vegetal: exercícios práticos**. 4ª Reimpressão (2002). Viçosa: UFV, 1998.

MCMURRY, John. **Química Orgânica**. 6º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, N. R. Controle da invasão biológica por capim-annoni em margem viária mediante a introdução de gramíneas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 260-269, 2011.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie**. Jena Fischer. 1937.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 445 - 451, 2004.

MUANGSIN, N.; SANGTHONG, S.; KRUSONG, K.; NGAMROJANAVANICH, N.; VILAIVAN, T.; PUTHONG, S.; CHANDCHAWAN, S. Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 4813-4818, 2011.

NACHTIGAL, G. F.; NEUMANN, E. L. F.; COSTA, F. A.; GARLICH, N. Ocorrência de ferrugem associada ao capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na região de fronteira da metade sul do RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; LIMA, R. K.; SALGADO, A. P. S. P.; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*piper hispidinervum* C.DC) e do emulsificante Tween 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria Alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **ACTA Amazônia**, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.

OLIVA, K. M. F. **Atividade alelopática de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre a germinação, crescimento e aspectos fisiológicos de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays***. 2006. 62 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**, Guaíba: Agropecuária, p. 362, 2001.

OLIVEIRA, L. G. A.; BELINELO, V. J.; ALMEIDA, M. S.; AGUILAR, E. B.; VIEIRA FILHO, S. A. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.7, n.12, 2011.

OLIVEIRA, M. C.; FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V. F.; DIAS, G. B. Germinação de sementes de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv 'gefner' submetidas a tratamentos com ácido giberélico (ga₃) e ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 544-554, 2010.

OLIVEIROS-BASTIDAS, A. J.; MACÍAS, F. A.; FERNÁNDEZ, C. C.; MARÍN, D.; MOLINILLO, J. M. G. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 198-213, 2009.

PANERO, F. S.; SILVA, H. E. B.; PANERO, J. S. **Chinese Journal Geochemistry**, v. 25, p. 165, 2006.

PERTILE, L. H.; LUTKEMEYER, E. R.; RUAS, T. L.; POZZEBOM, G. H. S.; BIAZUS, G.; SOSTER, M. T. **Efeito Alelopático e Supressivo de Extratos Vegetais na Germinação de Aveia preta (*Avena strigosa*)**. XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Vitória-ES, 2014.

PITELLI, R.A. **Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas.** Série Técnica IPEF, Piracicaba, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

PIZZOLATTI, M. G.; BRANCO, A. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE), **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 15-19, 2002.

QUEENSLAND GOVERNMENT. **Weeds of Australia – Biosecurity Queensland Edition.** Disponível em: <http://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/03030800-0b07-490a-8d04-0605030c0f01/media/Html/Euphorbia_heterophylla.htm>. Acesso em: 4 dez. 2012.

RAMIRES, A. C.; CONSTANTINI, J.; OLIVEIRA JR, R. S.; GUERRA, N.; ALONSO, D. G.; BIFFE, D. F. Controle de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* com a utilização de glyphoste isolado ou em associação com latifolicidas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 621 - 629, 2010.

REGO, S. S.; FERREIRA, M. M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F. Influência de Potenciais Osmóticos na Germinação de Sementes de *Anadenanthera colurina* (Veloso) Brenan (Angico-branco) – Mimosaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 549-551, 2007.

RICE, E. L. **Allelopathy.** 2^o ed. Orlando: Academic, p. 422, 1984.

SAMPIETRO, A. R. Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. **Hipertextos del Área de la Biología.** Disponível em: <<http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>>. Acesso em: 2 dez. 2012.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation.** 2^o ed. New Jersey: Humana Press, 2006.

SASAKI, Cristina M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme (Asteraceae).** 2008. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SEBASTIÃO, N. N.; MENDONÇA D. I. M. D; SANT'ANA, A. E. G.; DIAKANAMWA, C.; RUEFF, J.; MARTINS, C.; GASPAR, J. F.; SANTOS, A. F.; CORDEIRO, I. J. S. 8,15-Epoxyabdane and norlabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 798-803, 2010.

SILVA, A. A.; SILVA J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Ed. UFV, p. 367, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6^o ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SISODIA, S.; SIDDIQUI, M. B. Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. On some crop and weed plants. **Journal of Agricultural Extension and Rural Development**, v. 2, n. 1, p. 22-28, 2010.

SOUSA, R. A.; NETO, W. B.; POPPI, R. J.; BACCAM, N.; CADORE, S. **Química Nova**, v. 29, p. 654, 2009.

SOUZA, C. S. M.; SILVA, W. L. P.; GUERRA, A. M. N. M.; CARDOSO, M. C R.; TORRES, S. B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde de Agronegócio e Desenvolvimento Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 96-100, 2007.

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

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, R. L. Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de Cipó-d'alho (*Bignoniaceae*). **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009.

SOUZA FILHO, A. P. S.; LÔBO, L. T.; ARRUDA, M. S. P. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 557-564, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S., RODRIGUES, L. R. A., RODRIGUES, T. J. D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 165 - 170, 1997.

SOUZA FILHO, A. P. S., TREZZI, M. M., INOUE, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 709-716, 2011.

SPOTLIGHT. Galeria de fotos. Disponível em: <<https://www.fmcagricola.com.br/prod/utodetalhesfoto.aspx?codProd=48&codCult=191&codFoto=823>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

TREZZI, M. M. **Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo**. 2002. 132 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

VIDAL, Ribas A. **Interação negativa entre plantas: Inicialismo, Alelopatia e Competição**. UFRGS. Porto Alegre, 2010.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; LUCIA, R. M. D. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, v. 28, n. 4, 2004.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, n. 599, p. 1631-1646, 2002.

WALLER, G.R.; FEUG, M.C. & FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. & FOY, C.L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press, p. 75-98, 1999.

WANG, H.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; WANG, X.; LIU, L.; TONG, L.; CHEN, Y. Four new diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 211-216, 2013.

WANG, Q.; LI, Z.; RUAN, X.; PAN, C.; JIANG, D. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p.472 - 479, 2004.

ZEENI, R. D.; ZILLER, S. R. An overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 3, p. 431-446, 2011

ZHANG, Z. Y.; PAN, L. P.; LI, H. H. Isolation, identification and characterization of soil microbes which degrade phenolic allelochemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1839–1849, 2010.