

SAULO JOAQUIM FERREIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ALELOPÁTICO DO EXTRATO
DE CAULE DE *Pterodon emarginatus*
(SUCUPIRA BRANCA)**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia para a obtenção do título de
Mestre em Química Orgânica sob orientação do
Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernandez Terrones.

UBERLÂNDIA – MG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
2005

Quem conhece o outro é sábio

Quem conhece a si mesmo é iluminado

Quem vence a si mesmo é invencível

Quem conhece a alegria é rico

Quem conserva o seu caminho é inabalável

LAO TZU

A minha mãe Vicentina,

ao meu filho Gabriel,

A minha noiva Rosana,

Pela convivência e incentivos
permanentes.

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grato ao Professor Manuel Gonzalo Hernandez Terrones pela orientação, apoio e incentivos fundamentais em todas as fases deste trabalho.

Aos Professores Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Evandro Nascimento pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos amigos Polyana Radi, Gilberto V. Dumont, Jussara Martins, Iara M. Sousa e minha irmã Izaura A. Ferreira que de alguma forma contribuíram para com este trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I-----	11
1.1 Introdução-----	11
1.2 Natureza das substâncias alelopáticas-----	14
1.3 Vias de liberação e produção dos aleloquímicos-----	18
1.4 Mecanismo de ação-----	23
1.5 Fotossíntese-----	25
1.6 Sucupira branca (<i>pterodon emarginatus</i>)-----	31
1.7 Capim colônia (<i>panicum maximum</i>)-----	32
CAPÍTULO 2-----	33
2 Objetivo-----	33
CAPÍTULO 3-----	34
3.1 Materiais e instrumentos -----	34
3.2 Procedimento experimental-----	35
3.2.1 Obtenção do extrato metanólico-----	35
3.2.2 Fracionamento do extrato metanólico-----	35
3.2.3 Fracionamento das frações diclorometano e acetato de etila-----	37
3.3 Ensaio de germinação-----	39
3.4 descrição do aparelho e condições de análise-----	40
CAPÍTULO 4 -----	41
4. Resultados e discussões-----	41
Conclusão-----	56
Referências-----	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Rotas metabólicas de produção de aleloquímicos-----	17
FIGURA 2. Rotas prováveis seguidas pelos aleloquímicos-----	22
FIGURA 3. Síntese de ATP e formação de NADPH-----	27
FIGURA 4. Transporte de elétrons através do PSII-----	28
FIGURA 5. Fluxo total de elétrons-----	30
FIGURA 6. Árvore da sucupira branca-----	31
FIGURA 7. Capim colônia-----	32
FIGURA 8. Efeitos fitotóxicos do extrato de <i>P.emarginatus</i> sobre <i>P.maximum</i> em placas de petri.-----	41
FIGURA 9. Efeitos fitotóxicos do extrato de <i>P. emarginatus</i> sobre <i>P. maximum</i> em casa de vegetação-----	42
FIGURA 10. Efeitos fitotóxicos das frações de <i>P.emarginatus</i> sobre <i>P.maximum</i> em placa de petri-----	43
FIGURA 11. Efeitos fitotóxicos das subfrações de <i>P.emarginatus</i> sobre <i>P. maximum</i> em placas de petri-----	44
FIGURA 12. Espectro de infravermelho da subfração diclorometano/clorofórmio 1:1-----	45
FIGURA 13. Cromatograma do extrato diclorometano/ clorofórmio 1:1-----	46
FIGURA 14. Espectro de massas e IVTF do 2-metilpentan-1-ol-----	48
FIGURA 15. Espectro de massas e IVTF do 4-metilpent-3-em-2-ona-----	49
-	
FIGURA 16. Espectro de massas e IVTF do 1,2,4-trimetilbenzeno-----	50
FIGURA 17. Espectro de massas e estrutura do isobutil ftalato-----	51
FIGURA 18. Espectro de massas e IVTF do ácido hexadecanóico (ácido palmítico)-----	52
FIGURA 19. Espectro de massas e IVTF do (E)-3, 7, 11,15-tetrametilhexadec-2-em-1-ol (Trans-fitol)-----	53
FIGURA 20. Espectro de massas e IVTF do (9E, 12E)- octadeca-9,12-dienoato de metila -(Linoleato metila)-----	54
FIGURA 21. Espectro de massas e IVTF do Ácido (E)-octadec-9-enóico -(Ácido oléico)-----	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Solventes usados no fracionamento do extrato metanólico-----	36
TABELA 2: Relação dos solventes usados no fracionamento da fração diclorometano -----	37
TABELA 3: Relação dos solventes usados no fracionamento da fração acetato de etila -----	38
TABELA 4: Descrição do aparelho de CG-EM e das condições de análise.-----	40
Tabela 5: Compostos identificados na subfração diclorometano-clorofórmio (1:1)	47

LISTA DE ESTRUTURAS

Estruturas -----	57
------------------	----

RESUMO

Para avaliar o potencial alelopático da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*), foram preparadas soluções aquosas do extrato de matéria seca do caule nas concentrações 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 400 ppm. Com estas soluções e utilizando sementes de capim colonião (*Panicum maximum*), foram realizados ensaios de germinação em placas de Petri e em casa de vegetação. Os resultados obtidos destes ensaios de germinação serviram para verificar que, o extrato aquoso do caule da sucupira branca possui efeitos alelopáticos sobre a germinação das sementes, crescimento do caule e da raiz do capim colonião. Depois de confirmado o efeito alelopático, o extrato foi fracionado por filtração em coluna de vidro empacotada com sílica gel, gerando um total de oito frações com polaridades diferentes.

Com as frações obtidas, foram preparadas soluções aquosas na concentração de 200 ppm, e estas foram utilizadas para a realização de novos ensaios de germinação em placas de Petri. Nesta concentração, verificou-se um resultado alelopático satisfatório sobre o capim colonião em duas das frações. Estas duas frações foram fracionadas por cromatografia, gerando um total de treze subfrações. Com as subfrações obtidas, foram preparadas soluções aquosas de concentração 200 ppm, e estas utilizadas em ensaios de germinação em placas de Petri. A subfração que apresentou melhor resultado alelopático nos ensaios de germinação, foi investigada quanto aos seus componentes por IVTF e CG-EM. Sete compostos foram identificados nesta subfração, sendo estes 2-metilpentan-1-ol, 4-metilpent-3-en-2-ona, 1, 2,4-trimetilbenzeno, Ácido hexadecanóico, (E)-3, 7, 11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienolato de metila e ácido (E)- octadec-9-enóico.

Abstract

In order to evaluate the allelopathic potential of the white sucupira (*Pterodon emarginatus*) aqueous solutions from the dry matter of the stem have been done in the concentration of 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 and 400 ppm. These solutions were used against seeds of colonião grass (*Panicum maximum*), in experiments of germination in petri dishes and in green house . The achieved result of these experiments had the purpose to verify that the aqueous extract of the stem of the white sucupira has allelopathic effects in the germination of the seeds, and in the development of hypocotile and root of grass. After the allelopathic effect has been confirmed, the extract was fractioned by filtration in a glass column packed up with silica gel, resulting in an amount of eight fractions with different polarity.

Aqueous solutions were prepared with the fractions in concentration of 200 ppm and it has been used in germination experiments in petri dishes. In the concentration of 200 ppm, a satisfactory allelopathic result in colonião grass was achieved in two fractions. These two active fractions were submitted to separation in glass columns Chromatography , creating an amount of thirteen subfractions. These subfractions were tested as describe above (200 ppm).

The subfraction with the best allelopathic result in the experiments of germination was investigated by IVTF and CG-EM. Seven components were identified in this subfraction :2-methylpentan-1-ol,4-methylpent-3-en-2-ona,1,2,4-trimethylbenzene,Acid hexadecanoic,(E)-3,7, 11,15-tetramethylexadec-2-en-1-ol, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienolate of methyl and acid (E)- octadec-9-enoic.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

O termo alelopatia é definido como qualquer efeito causado por uma planta, ou microorganismos, sobre outras plantas, através de compostos químicos lançados no meio ambiente (Rice, 1984). Estes compostos são conhecidos como aleloquímicos, substâncias secundárias ou agentes aleloquímicos (Putnam e Duke 1978).

As influências exercidas pelos aleloquímicos podem apresentar características benéficas, tais como, prevenir a decomposição e interferir na dormência das sementes, ou estimular o crescimento das plantas. Também podem agir de modo prejudicial no desenvolvimento de um organismo, ou em uma sucessão de plantas remanescentes (Almeida 1988, M.M e Vidal, 2004). Sabe-se, também, que estas substâncias exercem papel importante na proteção dos organismos contra as pragas. Os aleloquímicos produzidos por uma planta podem ser venenosos para os insetos que delas se alimentam, pode ser usado como agente polinizador ou atuarem como atraentes ou repelentes. A natureza destas substâncias é percebida pelos insetos através dos quimio-recptores de que dispõem, e com os quais conseguem descriminá-las mesmo em concentrações muito baixas, distinguindo-se plantas que lhes são tóxicas das que são inócuas (Wilson, 1970, Dayn e Duke 2000, Ladyhensakaya et. al,1987). Apesar das plantas serem autotróficas, são imóveis, não podendo escapar do ataque de seus inimigos. É, portanto, compreensível que com a escassez de alternativas, utilizem com maior intensidade do que outros organismos, a estratégia dos compostos alelopáticos para sua defesa (Lovett, 1982).

Os efeitos alelopáticos são mais comuns em comunidades de plantas vizinhas, onde se interagem de forma fisiológica e bioquímica inibindo o crescimento ou a emergência de outras (Muller, 1969). Esses processos concedem uma participação especial de substâncias secundárias, as quais estão sempre presentes em conjunto com as substâncias orgânicas do solo. No nível do organismo da planta, o aleloquímico atua como um regulador exógeno do crescimento e desenvolvimento, e no nível de micropopulação de planta, atua como regulador da renovação (Grakhov e Didyk, 1996, Neave e Dawson, 1989).

Diversos trabalhos realizados nesta área apresentaram resultados convincentes que a maioria dos efeitos alelopáticos, são resultantes de um complexo de substâncias químicas, do que de um único componente químico isolado (Putnam, 1985).

As substâncias alelopáticas são produzidas pelas plantas durante todo seu ciclo de vida. Tais substâncias estão organizadas em diversas famílias de compostos, sendo distribuídas por todas as partes da planta de maneira não uniforme, em quantidades e concentrações variadas.

A liberação destas substâncias secundárias é realizada por processos físicos, químicos ou biológicos, por exsudação direta no solo pelas raízes, ou através da deterioração de raízes mortas, decomposição de folhas e caule, por volatilização, e podem, ainda, ser lixiviados das superfícies das plantas pela chuva ou orvalho (Almeida, 1988).

A forma de atuação das substâncias alelopáticas sobre outras plantas, não é totalmente específica ou conhecida. Algumas pesquisas têm mostrado que os aleloquímicos interferem no metabolismo, reduzindo a oferta de energia e conseqüentemente impedindo o desenvolvimento normal destes organismos. De modo geral, a interferência dos aleloquímicos ocorre com maior frequência na assimilação de nutrientes, na inibição da fotossíntese (Einhellig, et. al, 1993), na respiração (Neave e Dawson, 1989), na síntese de proteínas, na

permeabilidade da membrana celular, nas atividades enzimáticas e no desenvolvimento da planta (Caldiz e Fernández, 1999).

O conceito de alelopatia se distingue com nitidez de competição, que ocorre pela redução ou remoção do ambiente de um fator de crescimento necessário a ambas as plantas que vegetam no mesmo habitat, como a água, luz ou substâncias minerais, enquanto a alelopatia, ocorre pela adição de substâncias químicas no ambiente (Rice, 1984).

A alelopatia vem tornando-se uma linha de estudos de grande interesse para muitos pesquisadores, que ao longo dos anos estão sempre na expectativa de descobrir novas substâncias, que causam algum tipo de efeito benéfico ou deletério sobre o desenvolvimento de outras plantas ou microorganismos, visando diminuir o impacto ambiental causado pelos herbicidas sintéticos usados nas plantações. Também é de grande interesse descobrir substâncias que influenciam as interações planta-inseto e planta-animais superiores (Almeida, 1993).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as potencialidades alelopáticas e fitoquímicas presentes no extrato do caule da sucupira branca, uma espécie nativa da região de cerrado ou de transição normalmente utilizada em reflorestamento, sobre o capim colônia.

1.2 Natureza das substâncias alelopáticas

Um mesmo organismo produz diversos aleloquímicos, que desencadeiam várias interações. Muitas são as expectativas para isolar, identificar e quantificar todas as estruturas químicas destes compostos, pois, ainda existem dúvidas a respeito de sua atuação. Existem muitas dificuldades em identificar se o efeito alelopático causado é relativo a algum aleloquímico específico, já que os sintomas observados são determinados pelo conjunto de seus efeitos, tornando-se difícil, mesmo depois de identificados, qual deles provocam tais sintomas (Almeida, 1988). Alguns efeitos são mais expressivos do que outros, podendo ser diagnosticados com mais clareza. No entanto, substâncias químicas diferentes, podem apresentar algumas semelhanças na inibição dos diversos estágios de desenvolvimento de uma planta (Buss. et. al 2003).

Como exemplo de complexidade de produção destas substâncias, pode-se citar a vinca rósea na qual foram identificados mais de 100 compostos alelopáticos. Esses produtos secundários que são formados nas células apresentam ainda dúvidas como são exatamente biossintetizados (Swain 1977). Vários autores têm a opinião de que esses compostos tratam-se de simples resíduos do metabolismo celular que seriam armazenados nos vacúolos, onde se encontram em maior quantidade, a fim de evitar a sua própria autotoxicidade, ou simplesmente substâncias de reserva que a célula se serviria quando deles tivesse necessidade.

Esta teoria ficou ultrapassada após ter sido comprovado que esses produtos secundários são produzidos na célula com finalidade específica, e que a sua síntese obedecem às leis da genética (Swain 1977). Esta teoria ficou melhor esclarecida através de trabalhos publicados referentes a coleções de cultivares de pepino e aveia, onde verificou-se que os genótipos de uma mesma espécie elaboram produtos secundários diferentes, com ação alelopática diferenciada sobre outras plantas (Putnam e Duke, 1974). Baseado neste princípio

foi sugerido que, não obstante a natureza não tenha possivelmente selecionado as plantas pela sua potencialidade alelopática sobre as competidoras, essa seleção pode ser realizada pelo homem, em relação às espécies cultivadas, através da manipulação genética, da mesma forma como tem feito com outros produtos secundários envolvidos na proteção contra insetos e fungos (Boufalis e Pellissier, 1994).

As substâncias produzidas pelas plantas são agrupadas em famílias de acordo com suas similaridades biogenéticas, estas famílias compreendem os fenóis simples, ácidos orgânicos, aldeídos, lactonas simples insaturadas, terpenóides, esteróides, quinonas, flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa, álcoois, polipeptídeos, nucleosídeos e muitos outros ainda não identificados (Blum, 1995, Macías et. al.1992).

Os tecidos de muitas plantas possuem altas concentrações de glicosídeos cianogênicos tais como: amidalina, durrina e elinamarina. Quando estes compostos são hidrolisados podem liberar o ácido cianídrico que inibe, assim como a amônia, o etileno e o óleo de mostarda, a germinação, o crescimento radicular de diversas plantas. Em algumas plantas das regiões desérticas, ocorre a liberação da cânfora e do cineol que impedem o desenvolvimento de algumas espécies anuais (Putnam, 1985).

Os ácidos orgânicos como o málico, o cítrico e também as lactonas, as cumarinas, os alcalóides e os taninos hidrolisáveis são inibidores da germinação das sementes, do crescimento das plantas e também das bactérias fixadoras de nitrogênio e das nitrificantes do solo. Ácidos tricarboxílicos são os responsáveis pela toxicidade da planta do sorgo, sobre algumas culturas plantadas no terreno que contém seus resíduos (M.M. e Vidal, 2004, Cardona e Segura, 2004).

Da família das quinonas, apenas a substância juglona foi identificada como tóxica. Esta substância é encontrada nas folhas, frutos e casca da noqueira (*Juglans nigra*), e seu

efeito compreende toda extensão da área ocupada por sua copa e por suas raízes. Observações realizadas por Massey (1925) em plantações de tomate e alfafa em um raio de 25 metros do tronco da nogueira mostraram, que as plantas situadas em um raio de 16 metros do tronco morriam enquanto as plantas situadas em raio maior que 16 metros cresciam sadias (Putnan 1985).

Existem várias suspeitas que muitas substâncias encontradas na família dos flavonóides, possuem propriedades alelopáticas. No entanto, apenas algumas foram identificadas, tal como a florizina - encontrada nas raízes da macieira - que causa a inibição do crescimento das plântulas da própria espécie, e alguns de seus derivados são tóxicos para outras plantas (Blum et. al 1991, Boufalis e Pellissier, 1994).

Os óleos essenciais de uma planta possuem efeitos inibitórios que são caracterizados pela presença de substâncias terpenóides, onde os monoterpenóides são os compostos encontrados com maior frequência na maioria desses óleos. Os terpenos também podem estar relacionados com a destruição dos tecidos e lesões nas plantas superiores, estes efeitos, podem ser provocados pelos fungos que sintetizam estas substâncias (Almeida, 1988).

O efeito das plantas inibidoras do crescimento de outras é mais pronunciado em solos arenosos do que naqueles ricos em matéria orgânica, pois a inativação e destruição das toxinas são mais lentas em solos pobres. Baseado nesses aspectos é de se esperar maior influência alelopática em solos arenosos do que em solos ricos em microrganismo e frações coloidais (Barcik, 1999).

Na figura 1 são apresentadas as principais seqüências biogênese prováveis de síntese das principais categorias de agentes alelopáticos.

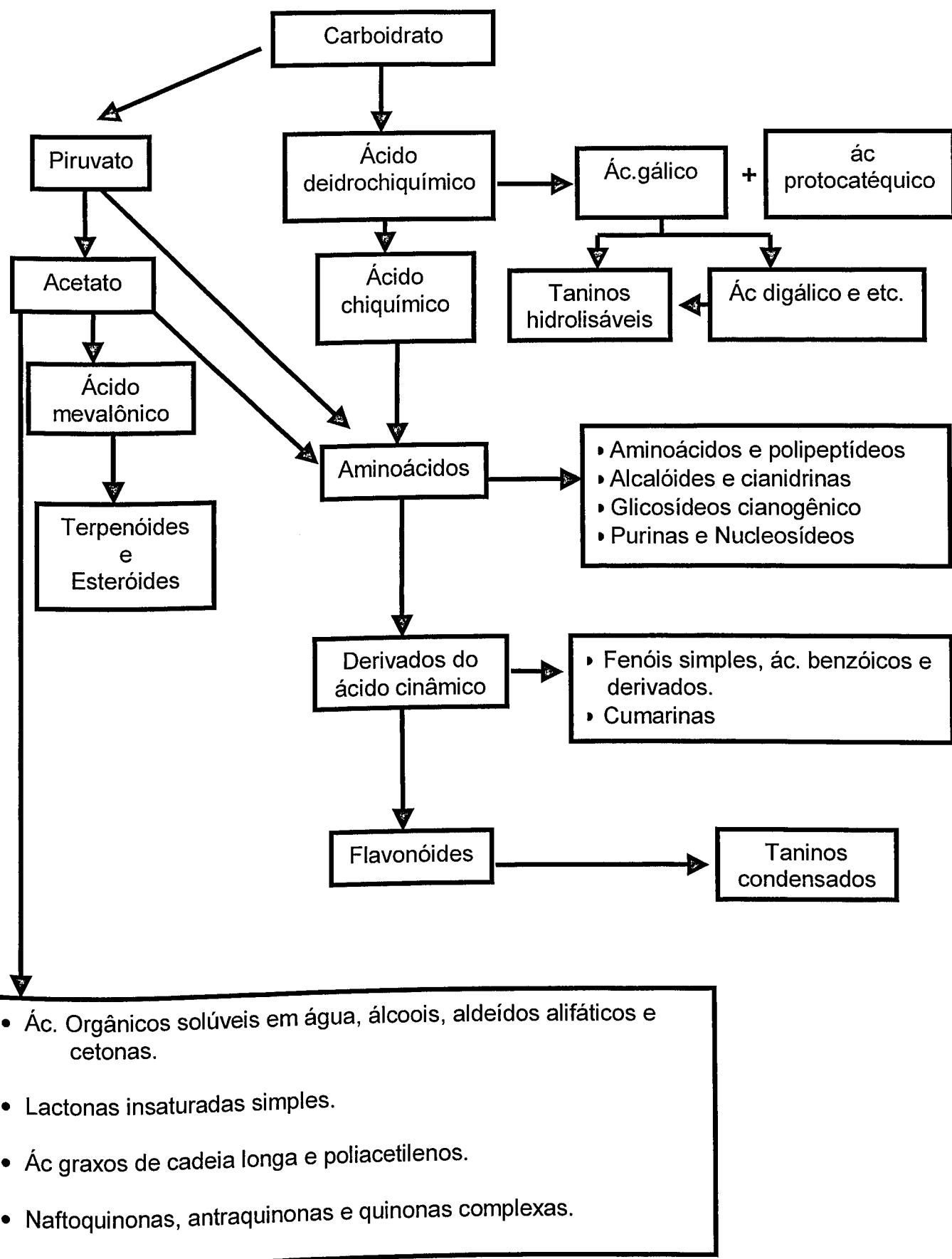


Figura 1- Rotas metabólicas de produção de aleloquímicos (adaptado de Rice 1984).

1.3 Vias de liberação e produção dos aleloquímicos

Todos os órgãos de uma planta têm capacidade de produzir aleloquímicos, onde a natureza química e a concentração não são iguais em todos eles. Estas variações dependem de cada espécie de vegetação. De um modo geral, os aleloquímicos estão distribuídos em maior concentração nas folhas, seguidas do caule, flores e raízes. Porém, muito pouco se conhece sobre o mecanismo celular envolvido na liberação do aleloquímico em tecidos vivos, e sobre o modo de regulação ou influência do ambiente neste processo, sendo que essa área demonstra ser um foco para investigação (Einhellig, 1995). Muitos destes produtos são autotóxicos. As plantas dispõem, porém de mecanismo de defesa contra eles, mantendo-os biologicamente inativos, como cristais insolúveis e gomas que se acumulam nas células sem interferirem nos seus processos vitais, ou ainda isolando-os em compartimento das células, como ocorre com as enzimas e antienzimas, que desta maneira ficam impedidas de interferir no metabolismo (Almeida, 1988).

A produção e a concentração destas substâncias são afetadas diretamente pela condição de estresse, estresse induzido, deficiência hídrica, aplicação de herbicidas, disponibilidade de nutrientes que compõem o solo, idade do tecido da vegetação e por fatores ambientais tais como: luz e temperatura (Einhellig, 1985, Tang, et. al 1995).

Alguns trabalhos realizados utilizando plantas de tabaco demonstraram, que esta vegetação quando foram expostas diretamente sobre luz vermelha, produziram mais alcalóides e menos ácidos fenólicos, do que aquelas expostas à luz vermelha distante (Kasperbauer et al., 1970). Observações feitas em culturas de girassol demonstraram, que a combinação de estresse hídrico com deficiência de nitrogênio, aumenta em 15 vezes a concentração dos ácidos clorogênico e isoclorogênico nas plantas (Del Moral, 1972). Em

diversas espécies de vegetações, o teor de compostos fenólicos e escopolina são aumentados quando a quantidade de boro, cálcio, magnésio, nitrogênio, fósforo, potássio, ou enxofre estão deficientes no solo (Putnam, 1985). Os taninos e seus derivados que estão presentes nas folhas das espécies arbóreas, como no carvalho e em outras plantas, teve a sua concentração aumentada com a idade. Esta maior concentração destes compostos explicam, porque as plantas mais novas são de maior suscetibilidade às doenças e mais atrativas para os insetos (Feeny, 1970).

As substâncias alelopáticas são liberadas pelas plantas no ambiente quando as folhas ou outras partes da planta caem no solo. Estas substâncias, também podem ser decompostas quimicamente pelas condições climáticas e por microorganismos. Tais modificações dão origem a produtos secundários que podem ser efetivos, influenciando direta ou indiretamente as espécies adjacentes (Almeida, 1988).

Essa liberação também será influenciada por temperaturas baixas ou altas, sendo que em temperaturas elevadas aumentam a volatilização e conseqüentemente aumenta o efeito inibitório. Tais mudanças metabólicas são importantes mecanismos de defesa da planta, induzindo a maior produção de aleloquímicos e, conseqüentemente, alterando as estratégias de manejo nas culturas (Einhellig, 1995, 1996).

A liberação de aleloquímicos pela volatilização é mais comum nas plantas aromáticas, como por exemplo, o mentrasto, losna-do-campo, losna-brava e eucalipto. As substâncias aleloquímicas volatilizadas podem ser absorvidas diretamente pelas plantas circunvizinhas, ficar condensadas no orvalho, ou entrarem no solo permanecendo no estado volátil sendo adsorvidos pelas partículas ou solubilizando-se na água. Entre as substâncias químicas que são liberadas por uma planta aromática, não ficam descartadas as possibilidades de algumas destas não exercerem efeitos alelopáticos sobre outras vegetações (Almeida, 1998).

A maior parte dos aleloquímicos voláteis pertencem à família dos terpenóides e monoterpenóides, estes compostos podem ser liberados continuamente pelas plantas, tendo sua liberação acentuada em condições de alta temperatura (Kawahara. et.al.2003, Nascimento e Lopes,2003 , Einhellig, 1985).

Uma pequena quantidade de inúmeros produtos químicos é exsudada pelas raízes, alguns dos quais com características alelopáticas. É difícil precisar com clareza se as substâncias alelopáticas encontradas no solo são provenientes exclusivamente das raízes ou produzidas pelos microorganismos, ou ainda se são liberadas pela decomposição dos resíduos orgânicos, onde incluem as células mortas desprendidas das raízes (Almeida, 1988 e Einhellig et al. 1995). Entre os compostos exsudados, podem ser citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido *trans*-cinâmico (Souza, 1988).

A quantidade e a natureza química dos exsudados diferem com a espécie e a idade da planta, com a temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera e composição do solo em que se encontram as raízes (Einhellig, 1985).

Um outro mecanismo que a planta dispõem para liberar aleloquímicos, é através do fenômeno da lixiviação. Neste processo, ocorre a remoção de substâncias químicas das plantas vivas ou mortas por ação da água, através de fenômenos naturais como chuva, orvalho ou neblina (Tukey Jr, 1970).

As toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes, ou ainda, dos resíduos vegetais em decomposição (Almeida, 1985). Os lixiviados são ricos em compostos orgânicos e inorgânicos classificados em tóxicos, tais como, alcalóides, terpenóides, ácidos orgânicos e fenólicos, inócuos ou estimulantes como os aminoácidos, açúcares, fitohormônios, e vitaminas. Esses compostos lixiviados podem ser degradados, sofrer transformações pelos

microorganismos, até mesmo serem inativados. Tais fenômenos contribuem para que as atividades dessas substâncias no solo sejam normalmente transitórias (Almeida, 1988).

Tratando-se das substâncias que sofrem decomposições, ainda devem ser consideradas as substâncias produzidas pelos microorganismos envolvidas nos processos, muitas das quais são poderosas toxinas (Einhellig, 1986).

Uma mesma substância ao sofrer degradações no solo, pode dar origem a diferentes substâncias químicas com diversas características de toxicidade, induzindo nas plantas os mais diferentes sintomas de atrofia de crescimento, clorose, inibição de desenvolvimento das raízes primárias e incremento das secundárias, abscisão prematura das folhas, retardamento da maturação, inibição da germinação das sementes e deficiência de reprodução (Almeida, 1988). É importante lembrar que as interações que ocorrem são muito complexas, pois, os produtos químicos presentes no meio podem vir diretamente de um simples organismo de planta ou surgirem como resultado dos processos de decomposição e formação do húmus no solo (Rodrigues et al, 1993).

Na figura 2 estão representados alguns possíveis caminhos seguidos por um aleloquímico, depois de ser liberado até causar o efeito na planta receptora.

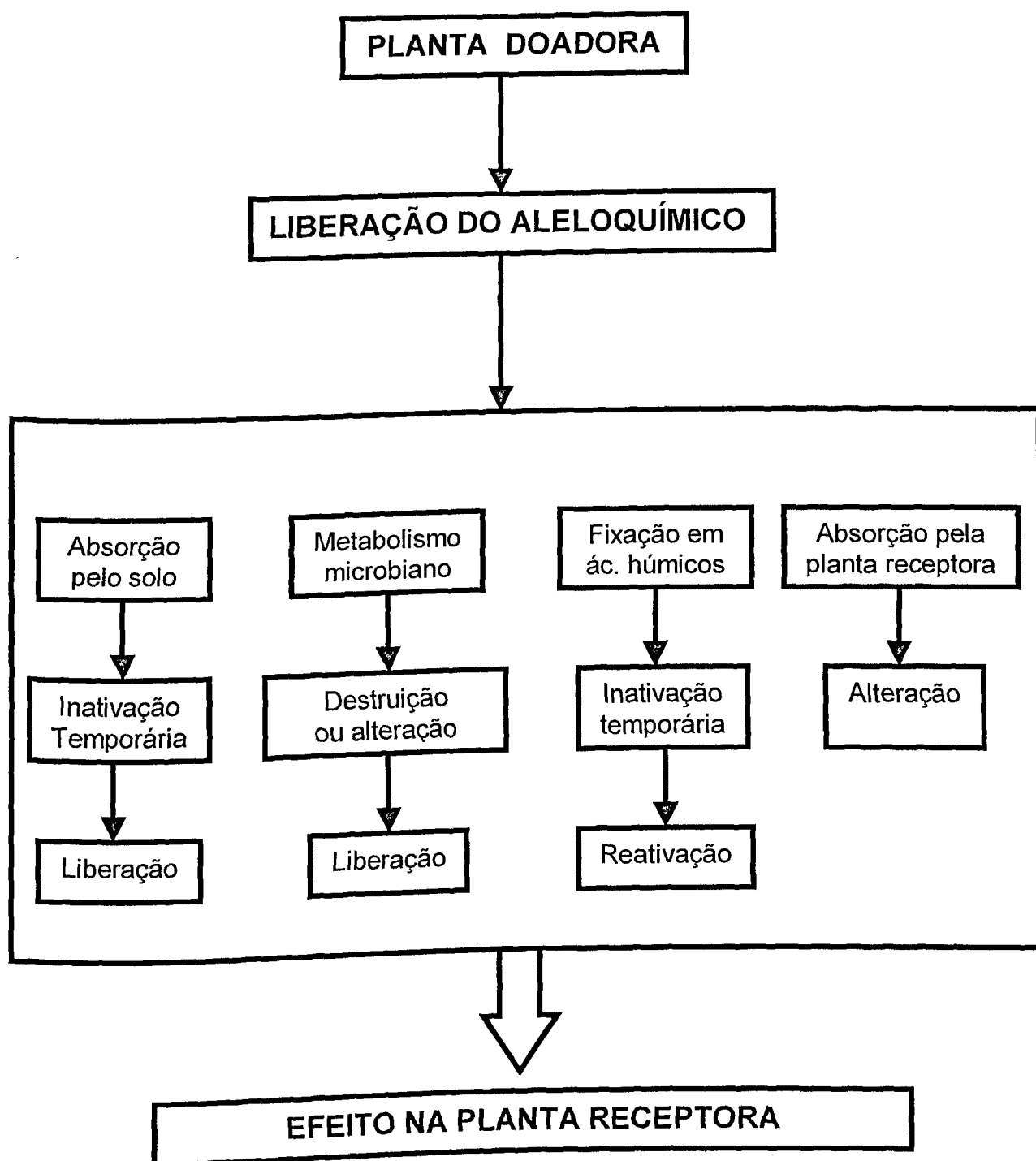


Figura 2- Rotas prováveis seguidas pelos aleloquímicos.(www. editora.ufla.br).

1.4 Mecanismo de ação

A maneira como os aleloquímicos atuam nas plantas tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, no entanto este processo ainda encontra-se pouco esclarecido. Sabe-se, porém, que o modo de atuação destas substâncias nos cloroplastos é bastante semelhante aos herbicidas convencionais inibidores da fotossíntese. A dificuldade de se entender este processo é porque, na maior parte dos casos, os aleloquímicos afetam mais de uma função nas plantas, provocando efeitos colaterais difíceis de se distinguir dos principais (Almeida, 1988).

Outro aspecto que deve ser considerado é que nem sempre os extratos obtidos de vegetais, podem ser considerados como material experimental adequado, pois as substâncias contidas neles não disponíveis na natureza (Rodrigues, 1992).

O sintoma alelopático percebido com maior frequência pelas plantas está na assimilação de nutrientes, que normalmente vem associado à deficiência de outras funções, como a permeabilidade da membrana celular e a respiração. Os compostos da família dos flavonóides estão entre os que mais afetam a assimilação de nutrientes, apresentando atividades superiores aos ácidos fenólicos neste tipo de inibição (Ladyzhenskaya et al. 1987, Manthe et al. 1992).

Os ácidos fenólicos atuam com mais eficiência na permeabilidade da membrana celular. Como exemplo, o ácido salicílico, quando em condições de pH baixo, reduz o teor de ATP nos tecidos das raízes, aumentando a permeabilidade aos íons. Em particular o íon potássio, que é perdido consideravelmente por esses tecidos das plantas (Blum, 1998).

Algumas substâncias alelopáticas da família das lactonas, flavonóides, terpenos voláteis e quinonas podem alterar a produção de ATP em diversas plantas, impedindo o processo respiratório nas mitocôndrias de culturas como aveia, abóbora e milho (Putnam, 1985).

Ácidos ferúlicos, cumarinas e quinonas impedem a incorporação de carbono nas proteínas das sementes e dos embriões de rosas e das algas respectivamente. Estes efeitos afetam diretamente no crescimento dos tecidos das plantas (Almeida, 1988; Neave e Dawson, 1989).

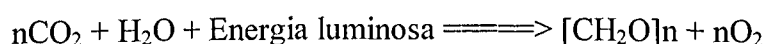
Pesquisas realizadas com vários aleloquímicos demonstraram que os ácidos clorogênico e caféico são inibidores, da atividade enzimática da fosforilase na batata. Foi também constatado que os taninos, inibe a atividade enzimática da peroxidase, catalase, amilase e várias outras enzimas, em diversas plantas, e que a secreção radicular de algumas culturas impede a atividade da catalase e a peroxidase na ançarinha-branca (*Chenopodium album*) e no caruru (*Amaranthus* ssp). (Almeida, 1988).

Muitos aleloquímicos são conhecidos como inibidores fotossintéticos, desacopladores ou aceptores de elétrons, como por exemplo, os compostos da família dos flavonóides que atuam na inibição do transporte de elétrons e no mecanismo da fotofosforilação nos cloroplastos. Compostos cumáricos e fenólicos, reduzem a fotossíntese por diminuir o conteúdo de clorofilas, sendo que os compostos cumáricos induzem, ainda, o fechamento dos estômatos (Elio et. Al 2004). Não se sabe ainda, em qual das etapas do transporte de elétrons estes compostos interferem, pois, o mecanismo da fotossíntese é muito complexo com diversas etapas dependentes de elétrons.

1.5 Fotossíntese

No nosso planeta a principal fonte de toda energia metabólica é o sol e a fotossíntese é essencial para manutenção de todas as formas de vida. A fotossíntese é o processo através do qual as plantas sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria prima inorgânica na presença da luz solar. Na fotossíntese, o processo químico principal consiste na conversão de dióxido de carbono e água em carboidratos e oxigênio (Hall, 1980).

O processo fotossintético das plantas ocorre nos cloroplastos e resulta na liberação de oxigênio molecular e na captura de dióxido de carbono da atmosfera, que é utilizado para sintetizar carboidratos. A fotossíntese pode ser representada pela seguinte equação empírica:



Em que, $[\text{CH}_2\text{O}]$ representa carboidrato (açúcares). A síntese de carboidratos a partir de dióxido de carbono e água requer um grande gasto de energia. A energia livre para a redução de um mol de CO_2 até o nível de glicose é de 478 KJ mol^{-1} .

A fotossíntese é um fenômeno muito complexo que compreende muitos processos físicos e químicos, que ocorrem de maneira coordenada em sistemas de proteínas, pigmentos e outros compostos associados a membranas. Em geral, o processo fotossintético é analisado em duas etapas interdependentes e simultâneas: 1) a etapa fotoquímica, fase "luminosa" e 2) a etapa química, também chamada de ciclo fotossintético redutivo do carbono, fase "escura".

Os produtos primários da etapa fotoquímica são o ATP e o NADPH_2 . Nessa etapa, também ocorre a liberação do oxigênio, como subproduto da dissociação da molécula da água. A etapa química da fotossíntese é uma etapa basicamente enzimática, na qual o CO_2 é fixado e reduzido até carboidratos, utilizando o NADPH_2 e o ATP produzido na etapa fotoquímica (Whatley, 1982).

Nas plantas, o processo fotossintético ocorre dentro dos cloroplastos, que são compostos de um sistema de membranas, conhecidas como membranas fotossintéticas, membranas tilacoidais ou lamelas, que contêm a maioria das proteínas necessárias para a etapa fotoquímica da fotossíntese.

As moléculas de clorofila atuam agrupadas. A luz é coletada por um complexo formado por 200-300 moléculas de pigmento, que estão ligados a proteínas formando a complexa rede coletora de luz. De acordo com essa concepção, a energia dos fótons absorvida pelas redes de pigmentos é transferida por ressonância indutiva para a citocromo P680 no fotossistema II e para a citocromo P700 no fotossistema I (centros de reações). Esses centros de reação transferem um elétron rico em energia para a Feofitina no PSII e A₀ no PSI (receptores), e recebem um elétron pobre em energia do resíduo de tirosina no PSII e plastocianina no PSI.

Atualmente, é bem conhecido que são quatro os complexos proteínicos associados às membranas dos tilacoides e essenciais para a produção do agente redutor (NADPH₂) e para a síntese de ATP.

- O Fotossistema II (complexo PSII-com seu complexo coletor de luz LHCII)
- O Fotossistema I (complexo PSI -com seu complexo coletor de luz LHCI)
- O Complexo citocromo *b₆/f*
- O complexo ATP-sintase (CFO-CF1).

A etapa fotoquímica começa com a absorção de energia luminosa pelos dois sistemas coletores antena LHCII e LHCI, associados respectivamente aos fotossistemas II (PSII) e I (PSI). A captura da energia luminosa possibilita a transferência de elétrons da molécula de água até o NADP⁺, com a formação de NADPH (forte agente redutor). A fotólise da molécula de água e o transporte de elétrons permitem a criação de um gradiente de prótons entre o

lúmen do tilacóide e o estroma do cloroplasto. Esse gradiente de prótons permite a síntese de ATP, via complexo ATP-sintase.

A seqüência do transporte de elétrons esta representada na figura 3.

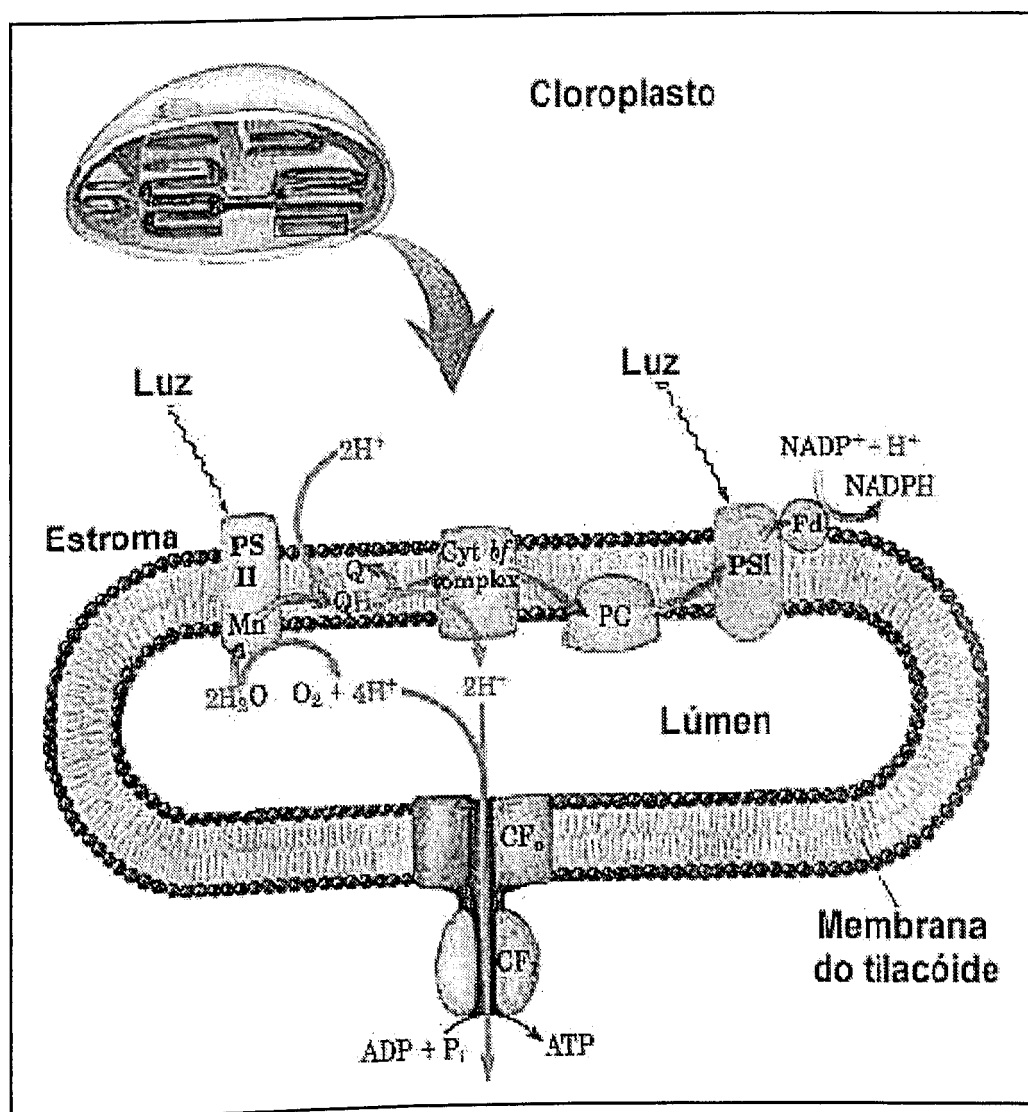


Figura 3 síntese de ATP e formação de NADPH (www.UFV.br/dbv/pg_fvg/).

O Fotossistema II é um complexo composto de mais de 15 polipeptídeos e, pelo menos, nove componentes redox (citocromo P $_{680}$, feofitina, plastoquinona, tirosina, Mn, Fe, citocromo b $_{559}$, carotenóides e histidina). O complexo central do Fotossistema II é formado

por proteínas intrínsecas e periféricas. O corpo central é formado por duas proteínas integrais chamadas D₁ e D₂, com massas moleculares de 33 e 31 kDa, respectivamente, formando o heterodímero D₁/D₂. Nos últimos anos, tem-se estabelecido que o heterodímero D₁/D₂ mantém ligado na sua estrutura os principais cromóforos e co-fatores envolvidos no transporte de elétrons através do PSII. Associados a proteína D₁, temos a molécula especial de clorofila *a* que atua como doador primário de elétrons (P₆₈₀), a feofitina (Phe) molécula de clorofila *a* modificada (2 átomos de H ao invés do átomo central de Mg), e que atua como acceptor primário de elétrons, a plastoquinona Q_B, quinona especial de plastídeo, que transporta elétrons da Q_A até o complexo citocromo *b₆/f*; e o doador secundário de elétrons Z (resíduo de tirosina), que transfere elétrons da molécula da água até o P₆₈₀. A proteína D₂ mantém ligada à sua estrutura a plastoquinona Q_A, que transfere elétrons da feofitina até a Q_B.

O transporte de elétrons através do fotossistema II é representado na figura 4.

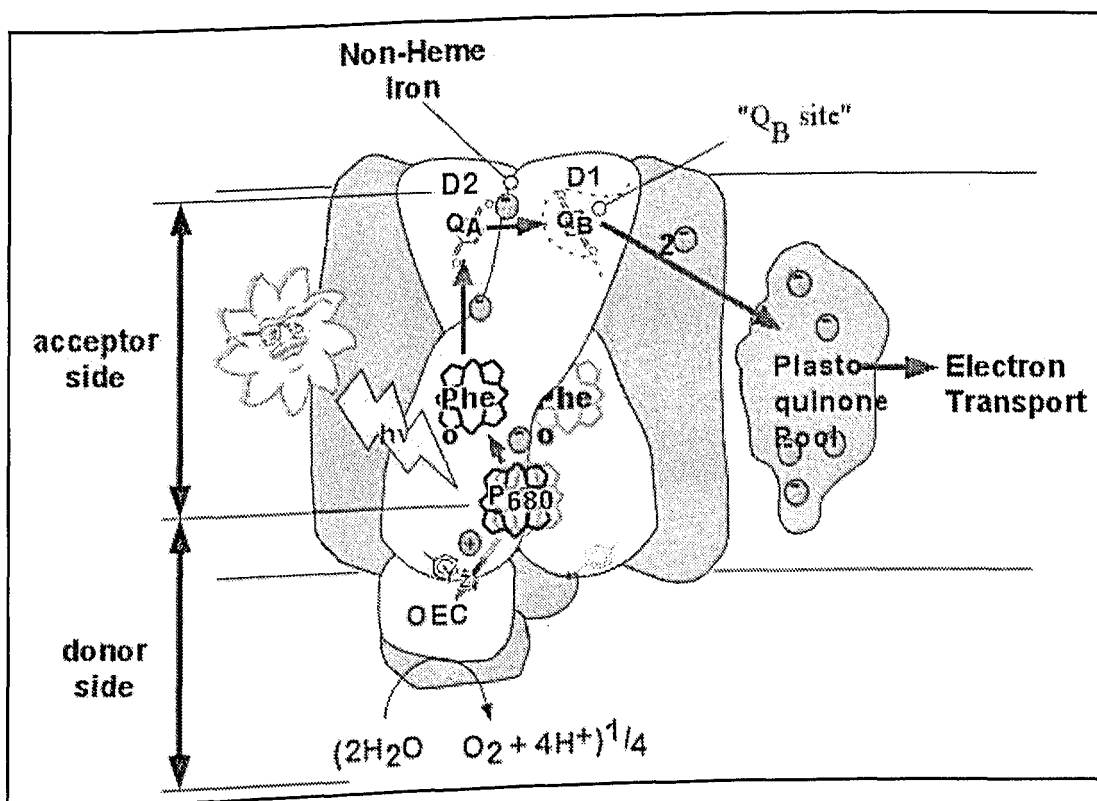
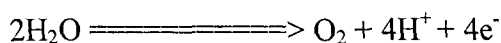


Figura 4 Transporte de elétrons através do PSII (www.UFV.br/dbv/pg_fvg/)

Em resumo, no fotossistema II, a molécula de água é oxidada até oxigênio e os elétrons gerados permitem a redução da plastoquinona. Na oxidação de duas moléculas de água, são removidos 4 elétrons, gerando-se uma molécula de oxigênio molecular e 4 íons hidrogênio.



O complexo citocromo *b₆f* transfere elétrons da quinona reduzida (PQH₂) até a plastocianina, que é uma proteína periférica móvel que contém cobre e que tem como principal função transferir elétrons do citocromo *b₆f* até o P₇₀₀, centro de reação do Fotossistema I.

O Fotossistema I é formado por um complexo multi-proteínico que mantém ligados vários transportadores de elétrons. O centro de reação é energizado por um complexo "antena" de aproximadamente 200 moléculas de clorofila *a*. A energia é transferida ao P₇₀₀, dímero de clorofila *a*. Associados ao PSI se encontram o A₀, monômero de clorofila *a*, centros Ferro-Enxofre (FeS_x, FeS_A, FeS_B), que transportam elétrons até a ferredoxina. O complexo Fotossistema I catalisa a oxidação da plastocianina e a redução da ferredoxina. Outra proteína associada ao Fotossistema I é a flavoproteína ferredoxina-NADP oxidoreductase, que reduz o NADP⁺ a NADPH₂, completando a seqüência do transporte não-cíclico de elétrons, que começa com a oxidação da molécula de água (www.UFV.br/dbv/pg_FVg/, Whatley, 1982)

Na figura 5 é demonstrada toda a seqüência do fluxo de elétrons através dos fotossistemas I e II.

TRANSPORTE DE ELÉTRONS NOS CLOROPLASTOS

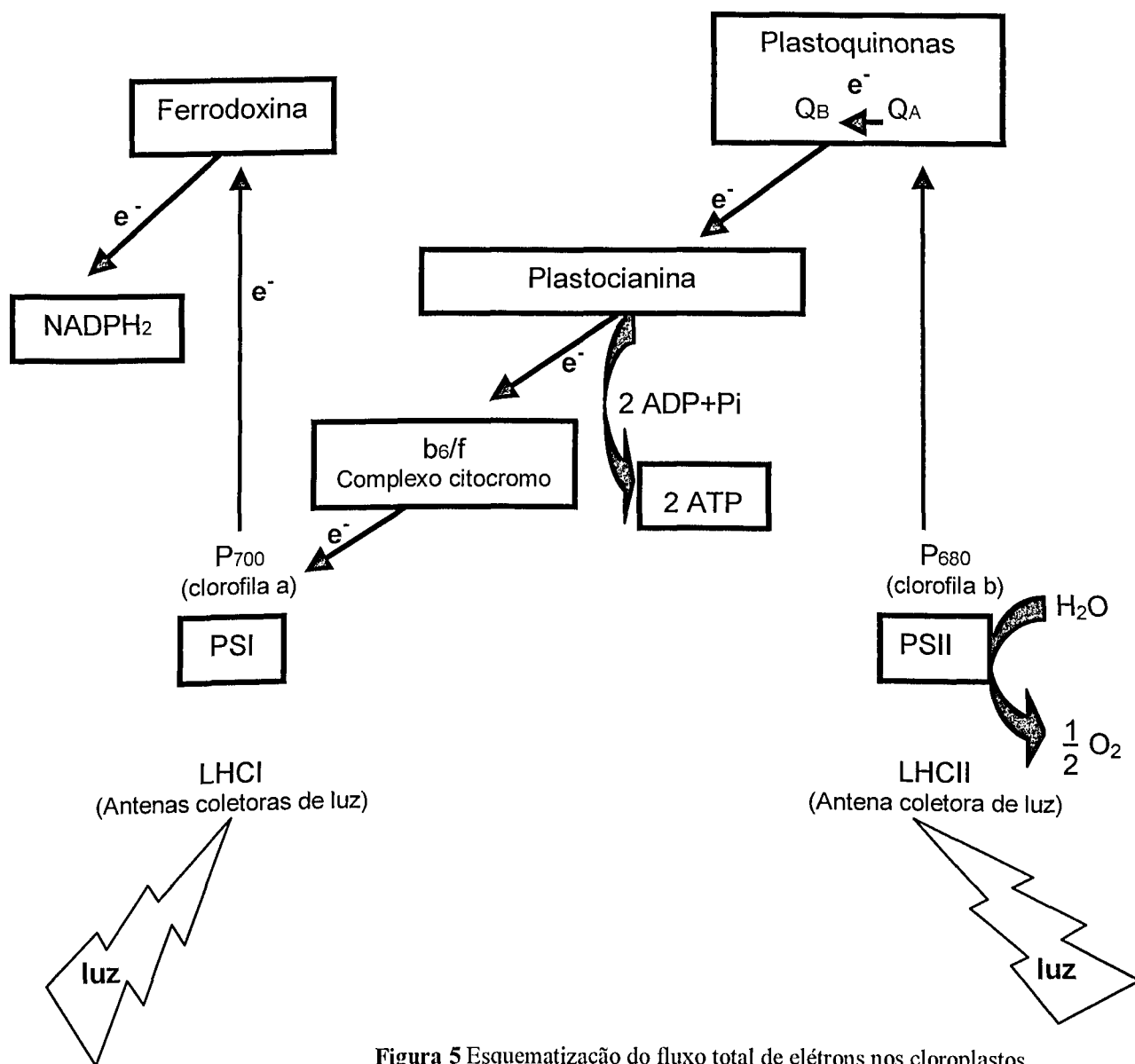


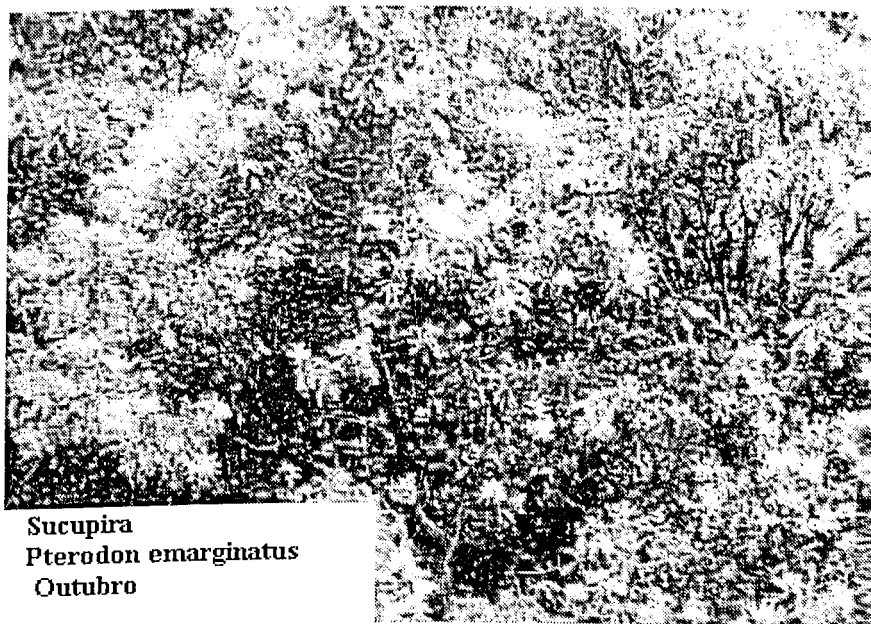
Figura 5 Esquematização do fluxo total de elétrons nos cloroplastos (modificado de Whatley, 1982).

1.6. Sucupira branca (*Pterodon emarginatus*)

Família: Fabaceae

Uma espécie comum da região do cerrado brasileiro ou da zona de transição das regiões de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. Esta espécie de vegetação também é utilizada em reflorestamento que visa o aproveitamento da madeira, na qual possui alta resistência natural ao apodrecimento. Possui propriedades medicinais antidiabética, antiinflamatória, antimutagênica, anti-reumática. As propriedades antibióticas estão no óleo extraído de seu fruto que é usado no tratamento de infecções de garganta e reumáticas, e as túberas radiculares (batatas) são utilizadas no controle dos diabetes.

A espécie *Pterodon emarginatus* começa a florescer a partir do mês de outubro com flores de cor roxa clara, que perduram até o mês de novembro. As flores possuem de 30 a 36 folíolos, de 2 a 3 cm de comprimento, e uma única semente na vagem. A semente é de cor clara com estrutura esponjosa.



Sucupira
Pterodon emarginatus
Outubro

Figura 6 árvore da sucupira branca (www.arvores.brasil.nom.br/florin.sucupi.htm).

1.7 Capim Colonião (*Panicum maximum*)

Família: Gramineae

Subfamília: Panicoideae

O capim colonião é uma espécie exótica de origem africana, trazida para o Brasil pelos navios negreiros. É um capim com características perenes, tolerantes ao frio e a seca, possui sistema radicular profundo, forma touceiras grandes de até 1,5 m de diâmetro constituído de colmos que saem de rizomas curtos. A altura da touceira é de 1,80 até 4 m, com colmos retos, duros e folhas em todo o seu comprimento. O tamanho e a textura das folhas variam muito, havendo tipos de folhas largas de até 4 cm e estreitas de 1 a 2 cm de largura. As lâminas são de cor verde -azulada brilhante com face dorsal áspera. Os bordos da lâmina foliar são duros e serrilhados. Lígula grande medindo até 4 mm, rica em pêlos no bordo e em grande quantidade inserida na base do lado dorsal. É muito utilizado no pastoreio e fenação, para a alimentação de bovinos, eqüinos e ovinos (Mitidieri, 1983).



Figura 7 Capim colonião (www.sementesoesp.com.br/show.gramíneas.php?id=14).

CAPÍTULO II

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar as propriedades alelopáticas e fitoquímicas presentes no extrato do caule de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca), e através de métodos cromatográficos e espectrométricos, identificar qual substância ou grupo de substâncias que são responsáveis por tais efeitos. Para atingir este objetivo, foram realizados diversos ensaios de germinação em placas de petri e em casa de vegetação utilizando soluções preparadas em várias concentrações do extrato metanólico, frações e subfrações extraídas do caule da planta. Foram utilizadas sementes de *Panicum maximum* (capim colonião), considerada erva daninha para muitas culturas, como planta alvo do efeito.

CAPÍTULO III

3.1 Materiais e instrumentos

Caule de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca).

Semente de *Panicum maximum* (capim colônia),

Metanol P. A. (CH_4O)

Hexano P. A. (C_6H_{14})

Dicloro metano P. A. (CH_2Cl_2)

Acetato de etila P. A. ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)

Clorofórmio P. A. (CHCl_3)

Galões de plástico.

Evaporador rotativo, Tecnal/TE-058.

Colunas de vidro.

Placas de cromatografia.

Lâmpada ultravioleta.

Placas de Petri.

Papel de germinação.

Germinador de sementes tipo MANGELSDORF

Aspirador/ modelo A

Funil de fundo poroso.

Balões de 100 ml.

Liquidificador.

Sílica gel 60- 70-230 mesh ASTM

Aparelho de infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) Perkin Elmer

Spectrum 1000

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Obtenção do extrato metanólico

Para obtenção do extrato, foram utilizados aproximadamente 3,00 kg de material vegetal (caule) e 10 litros de metanol P.A. O material vegetal primeiramente foi lavado com água, seco em estufa a 40°C, picado, triturado em liquidificador, e imerso em galões de plástico durante quinze dias com solvente metanol P.A. Este procedimento foi realizado em temperatura ambiente e com agitações periódicas.

Após este período de extração, o material foi filtrado em funil de placa porosa, e o filtrado obtido foi concentrado por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida.

Deste extrato foram preparadas soluções aquosas de concentrações 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 400 ppm, nas quais foram utilizadas para ensaios de germinação em placas de petri e em casa de vegetação.

3.2.2 Fracionamento do extrato metanólico

O extrato metanólico primeiramente foi incorporado à sílica gel em proporções equivalentes. A incorporação foi conduzida até que o extrato obtivesse aspecto de um pó homogêneo, para este procedimento utilizou-se o evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura que não excedeu 40 °C. Após este procedimento, a mistura foi colocada em um sistema de filtragem constituído de uma coluna cromatográfica empacotada com sílica gel

como fase estacionária. E através das análises cromatográficas em camada delgada, foi possível definir a seqüência dos solventes (fase móvel) a serem usados para separar as primeiras frações do extrato metanólico. Com este fracionamento obteve-se um total de oito frações com aspectos e cores diferentes. Cada uma destas concentradas a vácuo. A relação dos solventes e as frações obtidas estão representadas na tabela 1.

Em seguida foram realizados os ensaios de germinação em placas de Petri, utilizando soluções aquosas de concentração 200ppm destas oito frações. As soluções aquosas das frações foram preparadas utilizando 0.200g da amostra, primeiramente diluída em 1mL de solvente N, N –dimetilformamida, e o volume completado com água.

Tabela 1: Solventes usados no fracionamento do extrato metanólico.

Fração	Hexano	Diclorometano	Clorofórmio	Acetato de etila	Metanol
1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0
3	0	0	1	0	0
4	0	0	0	1	0
5	0	0	0	9	1
6	0	0	0	7	3
7	0	0	0	5	5
8	0	0	0	0	1

As frações extraídas com o solvente diclorometano (2) e com o solvente acetato de etila (4), apresentaram maior porcentagem de inibição sobre a germinação das sementes, desenvolvimento do caule e raiz da planta do capim colonião. De acordo com estes resultados, estas frações foram escolhidas para um posterior fracionamento.

3.2.3 Fracionamento das frações diclorometano e acetato de etila

Para realizar um segundo fracionamento, as frações diclorometano e acetato de etila foram incorporados à sílica gel em proporções equivalentes, e o fracionamento realizado por cromatografia utilizando sílica gel como fase estacionária e os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio e metanol com fase móvel. As seqüências dos solventes a serem usadas, e as proporções entre eles, foram definidas pela cromatografia em camada delgada.

Com este fracionamento obteve-se um total de treze subfrações, sendo seis extraídas da fração do diclorometano e sete extraídas da fração do acetato de etila. Cada uma destas concentrada a vácuo. Em seguida foram preparadas soluções aquosas de 200 ppm, que foram utilizadas nos ensaios de germinação em placas de Petri.

Nas Tabelas 2 e 3 estão relacionadas às proporções dos solventes orgânicos usados para obtenção das subfrações, a partir da fração do diclorometano e do acetato de etila.

Tabela 2: Relação dos solventes usados no fracionamento da fração diclorometano.

Subfrações	Hexano	Diclorometano	Clorofórmio
1	2	5	3
2	3	6	1
3	0	5	5
4	3	5	2
5	4	5	1
6	0	1	0

Tabela 3: Relação dos solventes usados no fracionamento da fração acetato de etila.

Subfrações	Acetato de etila	Clorofórmio	Metanol
7	5	4	1
8	4,5	4,5	1
9	5	5	0
10	6	4	0
11	6	4	0
12	6	4	0
13	6	4	0

3.3 Ensaio de germinação

Para proceder aos ensaios de germinação, primeiramente foi realizada a quebra de dormência das sementes de *P. maximum* (com ácido sulfúrico concentrado) pré-selecionadas e esterilizadas durante 2 minutos com hipoclorito de sódio 10% m.v⁻¹.

Nos ensaios de germinação (para a verificação do potencial fitotóxico) foram utilizadas, em triplicata, concentrações de 0 (controle), 25, 50, 100 e 150 ppm do extrato metanólico para os bioensaios feitos em placas de Petri (*in vitro*) e concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 ppm do mesmo extrato para os bioensaios feitos em condições de casa de vegetação (*in vivo*), em água destilada. As placas de Petri com papel de filtro foram previamente esterilizadas em autoclave e cada parcela experimental foi constituída de 15 sementes. A terra utilizada para os ensaios *in vivo* também foi esterilizada em autoclave e cada parcela experimental foi constituída de 10 sementes. As placas de petri foram transferidas para uma câmara de germinação onde permaneceram por um período de 15 dias, à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 10 horas. Os testes que foram feitos em condições de casa de vegetação tiveram o mesmo período de germinação, e uma vez que estes foram realizados com o objetivo de estarem o mais próximo possível das condições reais de cultivo, foram realizados à temperatura ambiente e fornecimento de luz solar, com fotoperíodo de aproximadamente 11 horas.

Após o período de germinação, mediu-se o comprimento do caule e das raízes para determinação da porcentagem de inibição; determinou-se também a quantidade de sementes que germinaram para verificar se há inibição pré-emergente.

3.4 Descrição do aparelho e condições de análise

A CG-EM foi realizada em um cromatógrafo da marca Shimadzu GC-17A/QP 5000.

As condições operacionais são mostradas na tabela 4.

Tabela 4. Descrição do aparelho de CG-EM e das condições de análise.

Equipamento e condições de análise (em ° Celsius)	Shimadzu GC-17/ QP-5000 com coluna DB-5 (30 metros x 0,25 mm d.i.)
Coluna	Temperatura inicial de 60 °C e razão de aquecimento de 3°/minutos até 240° por 20 minutos, com tempo total de corrida de 100 minutos.
Injetor	220
Interface	240

A espectrometria de massa foi feita com energia de impacto de 70 eV e foram coletados fragmentos de 40 a 650 Da. Para a identificação dos compostos foi usada uma biblioteca de espectros de massa acoplada ao aparelho (Wiley 239) e índices de Kovaf's. Foram considerados apenas compostos com porcentagem média acima de 1,0 %. O volume injetado foi de 1,0 μ L.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 8 estão representados os resultados dos ensaios de germinação feitos com o extrato metanólico em placas de petri.

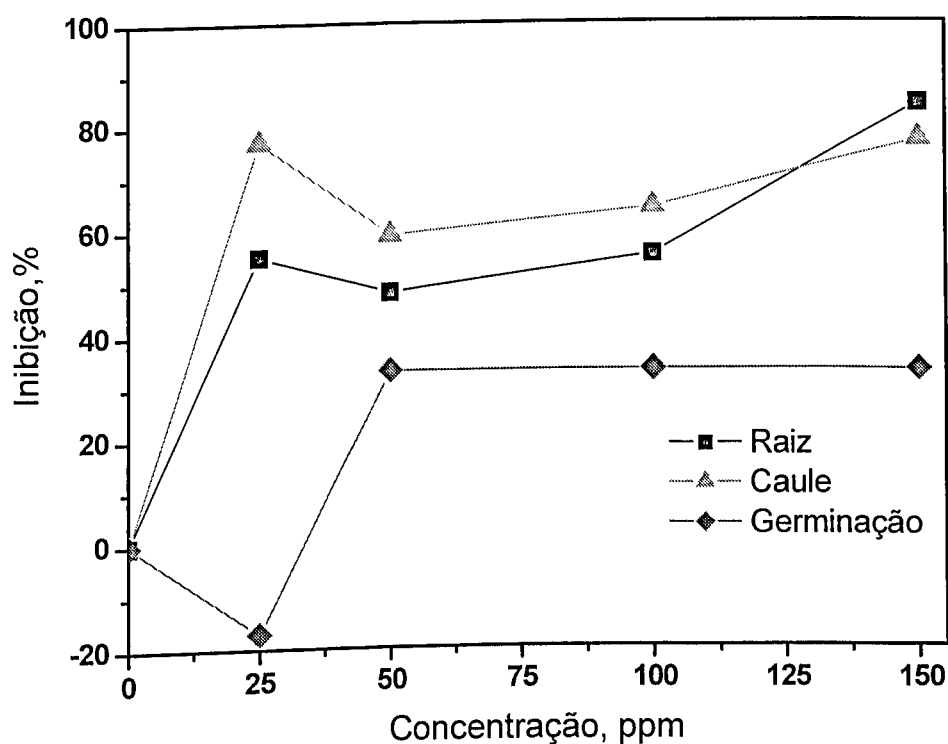


Figura 8. Efeitos fitotóxicos do extrato de *P. emarginatus* sobre *P. maximum* em placas de Petri.

Pode-se observar que o extrato bruto de *P. emarginatus* possui atividade inibitória no desenvolvimento da raiz, no desenvolvimento do caule e na porcentagem de germinação. A inibição da germinação das sementes não foi tão expressiva, ficando aproximadamente em 30% para concentração de 50 ppm, sendo mantida para outras concentrações maiores. Observa-se também que a germinação foi favorecida com a solução de 25 ppm. A solução de 25 ppm inibiu o crescimento do caule mais que o da raiz, mas a inibição destes é praticamente

igual com a solução de 150 ppm. Nas soluções de 50 e 100 ppm a inibição do caule e da raiz foi menor que na solução de 25 ppm. A partir de 50 ppm a inibição voltou a aumentar até a concentração de 150ppm, atingindo o maior índice de inibição.

Na figura 9 estão representados os resultados dos ensaios de germinação feitos com o extrato metanólico em casa de vegetação.

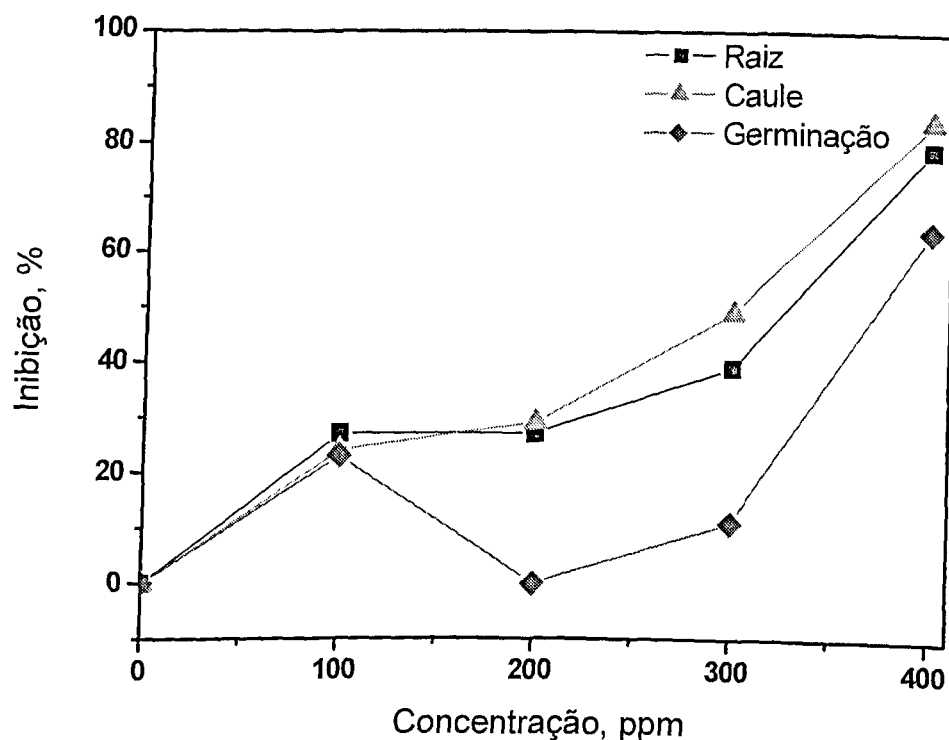


Figura 9. Efeitos fitotóxicos do extrato de *P. emarginatus* sobre *P. maximum* em casa de vegetação.

Na figura 9 observa-se que na concentração de 100 ppm a inibição da germinação, do caule e da raiz é aproximadamente igual a 25%. Permanecendo praticamente neste patamar na concentração de 200 ppm, e aumentando o poder inibitório para o caule e raiz com o aumento na concentração. Apenas a inibição da germinação apresentou um decréscimo com a solução de 200 ppm, mas esta voltou a crescer com as concentrações de 300 e 400 ppm.

As figuras 8 e 9 mostram que o extrato bruto de *P. emarginatus* apresenta propriedades fitotóxicas tanto nos ensaios *in vitro* quanto nos ensaios *in vivo*, mas nos ensaios *in vivo* foi requerida uma concentração bem maior que aquelas dos ensaios *in vitro*, provavelmente pela

ação dos microorganismos presentes nos solo que absorvem e decompõem os compostos fitotóxicos.

Na figura 10 estão representados os resultados dos ensaios de germinação das frações que apresentaram inibição na concentração de 200 ppm.

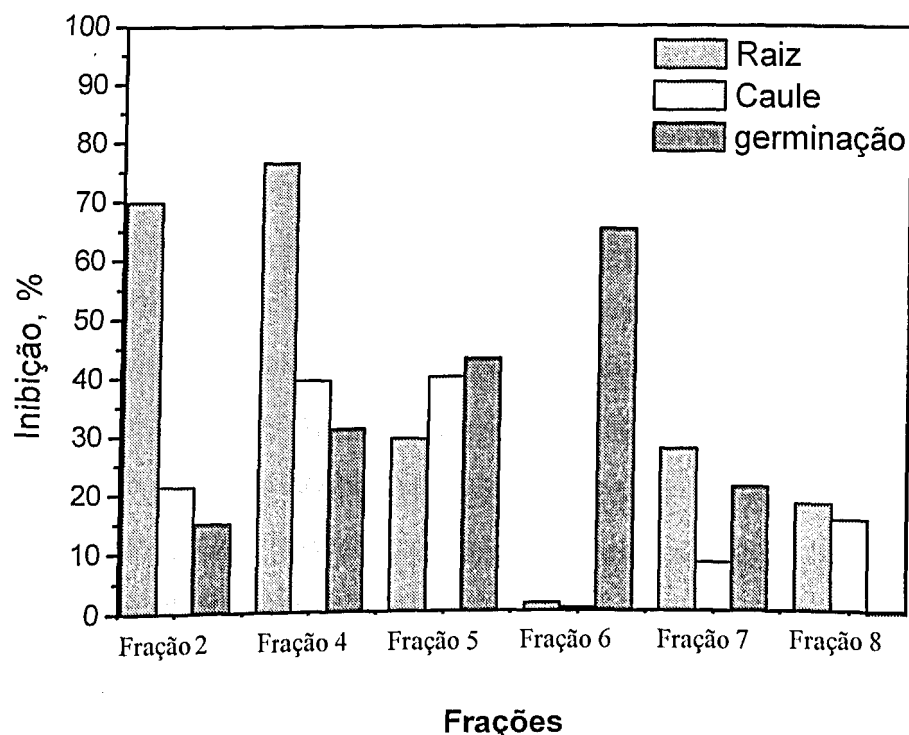


Figura 10. Efeitos fitotóxicos das frações *P. emarginatus* sobre *P. maximum* em placa de petri.

As frações que mais inibiram o crescimento da raiz foram obtidas com diclorometano (fração 2) e com acetato de etila (fração 4). A fração acetato de etila/metanol (9:1, v/v) (fração 5), apresentou inibição aproximadamente entre 30 e 45% na germinação das sementes e no desenvolvimento do caule e raiz. A fração acetato de etila/ metanol (7:3, v/v) (fração 6), teve inibição expressiva apenas sobre a germinação das sementes. A inibição da fração acetato de etila/ metanol (1:1, v/v) (fração 7) foi abaixo de 30%. A fração obtida com metanol (fração 8) apresentou baixa taxa de inibição no desenvolvimento do caule e da raiz e ainda estimulou a germinação das sementes. As frações que mais apresentaram inibição no crescimento da raiz e/ou do caule (frações 2 e 4) foram escolhidas para um segundo fracionamento e obtenção de

subfrações. As frações (1 hexano) e (2 clorofórmio) não apresentaram resultados satisfatório nos ensaios de germinação.

Na figura 11 estão representados os resultados da avaliação fitotóxica das subfrações.

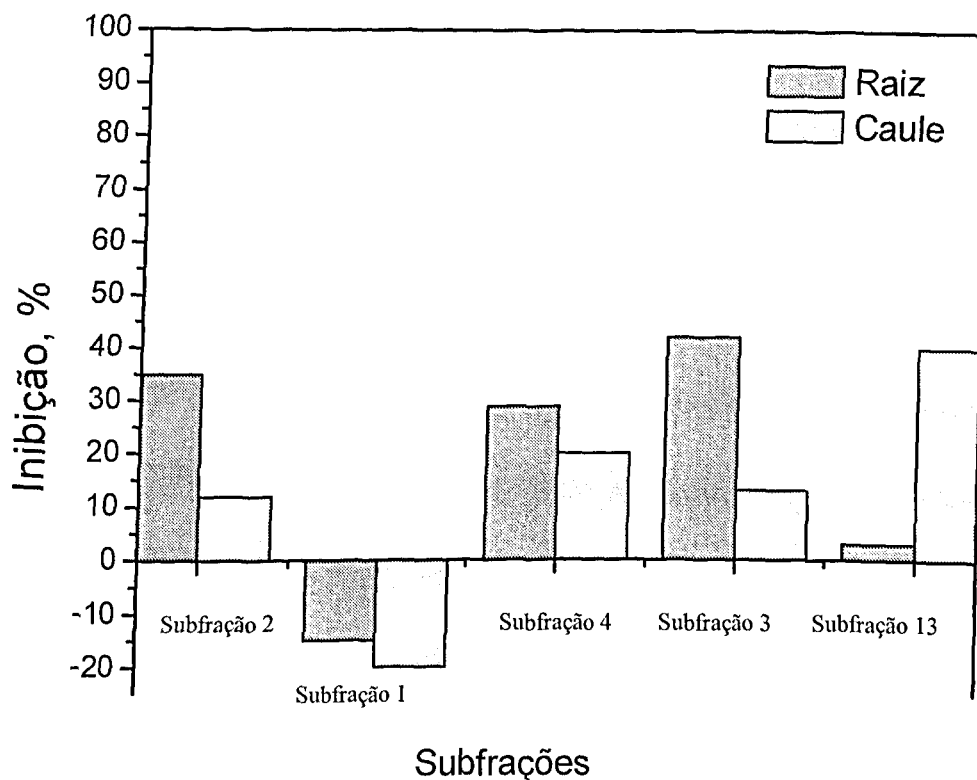


Figura 11. Efeitos fitotóxicos das subfrações de *P. emarginatus* sobre o *P. maximum* em placa de petri.

A subfração que apresentou maior inibição no crescimento da raiz foi extraída com a mistura de solvente diclorometano/ Clorofórmio (1:1, v/v) (subfração 3) e a que apresentou maior inibição no crescimento do caule foi a subfração de acetato de etila/clorofórmio 6:4 (subfração 13). A subfração hexano/diclorometano/clorofórmio (2:5:3 v/v/v) (subfração 1), estimulou o crescimento da raiz e do caule em aproximadamente 15 e 20% respectivamente. A subfração hexano/ diclorometano/ clorofórmio (3:5:2 v/v/v) (subfração 4), inibiu o desenvolvimento do caule e da raiz em menos de 30%. A subfração hexano/diclorometano/clorofórmio (3:6:1 v/v/v) (subfração 2), inibiu o crescimento da raiz em 30% e do caule abaixo de 15%.

Os compostos presentes na subfração 3 que apresentou maior atividade foram identificados por espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Na figura 12 é apresentado o espectro IVTF da amostra diclorometano: clorofórmio (1:1, v/v).

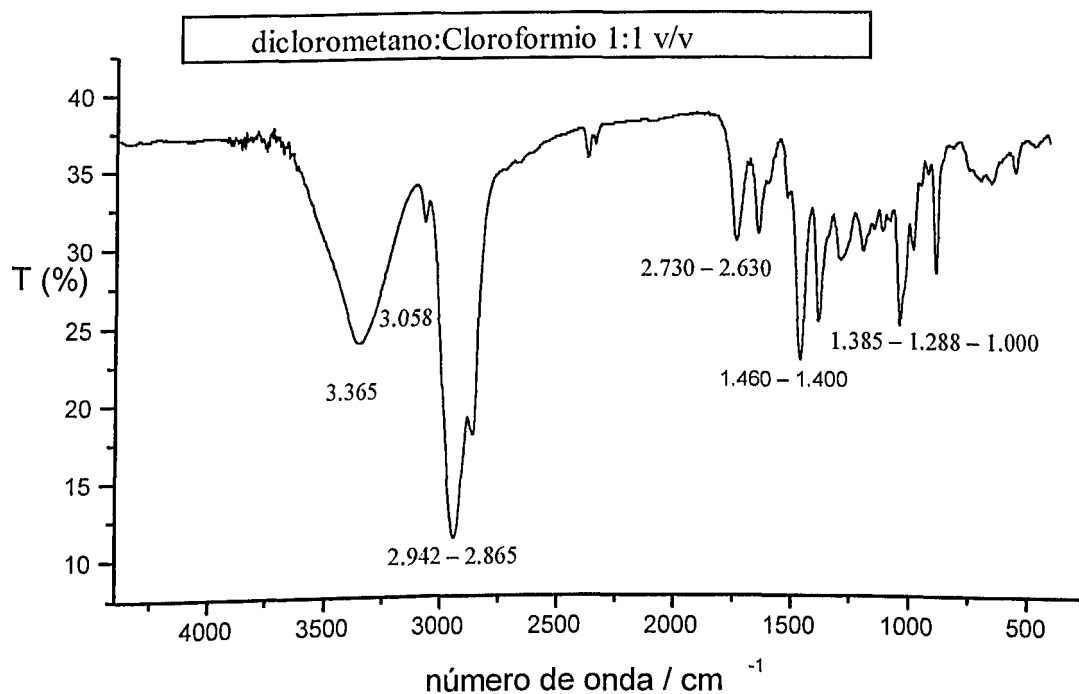


Figura 12. Espectro de Infravermelho da subfração diclorometano-clorofórmio (1:1,v/v)

Análise dos principais picos.

Pico 3365cm^{-1} – estiramento O-H, deformação axial em hidrogênio intermolecular.

Pico 3058cm^{-1} – bandas de deformação axial do C-H de aromático.

Pico 2942cm^{-1} a 2865cm^{-1} – bandas de deformação axial do C-H em composto alifático.

Pico 1730cm^{-1} – bandas de deformação axial de C=O.

1635cm^{-1} C=O conjugada e C=C, CH=CH-CH=CH dos ácidos carboxílicos, éster, aldeídos, cetonas e alquenos respectivamente.

Pico 1460 cm^{-1} – deformação angular de CH_2 e CH_3 , vibrações de esqueleto envolvendo deformação axial das ligações $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos.

Pico 1385 cm^{-1} – bandas de deformação axial do CH_3CO .

Pico 1288 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} – bandas de deformação angular de $\text{C}-\text{O}$.

Na figura 13 é mostrado o cromatograma obtido no aparelho CGEM, da amostra.

Observa-se na tabela 5, a presença significativa do 4-metilpent-3-en-2-ona (pico 2), (E)-3, 7, 11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol (pico 6) e (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienolato de metila (pico 7).

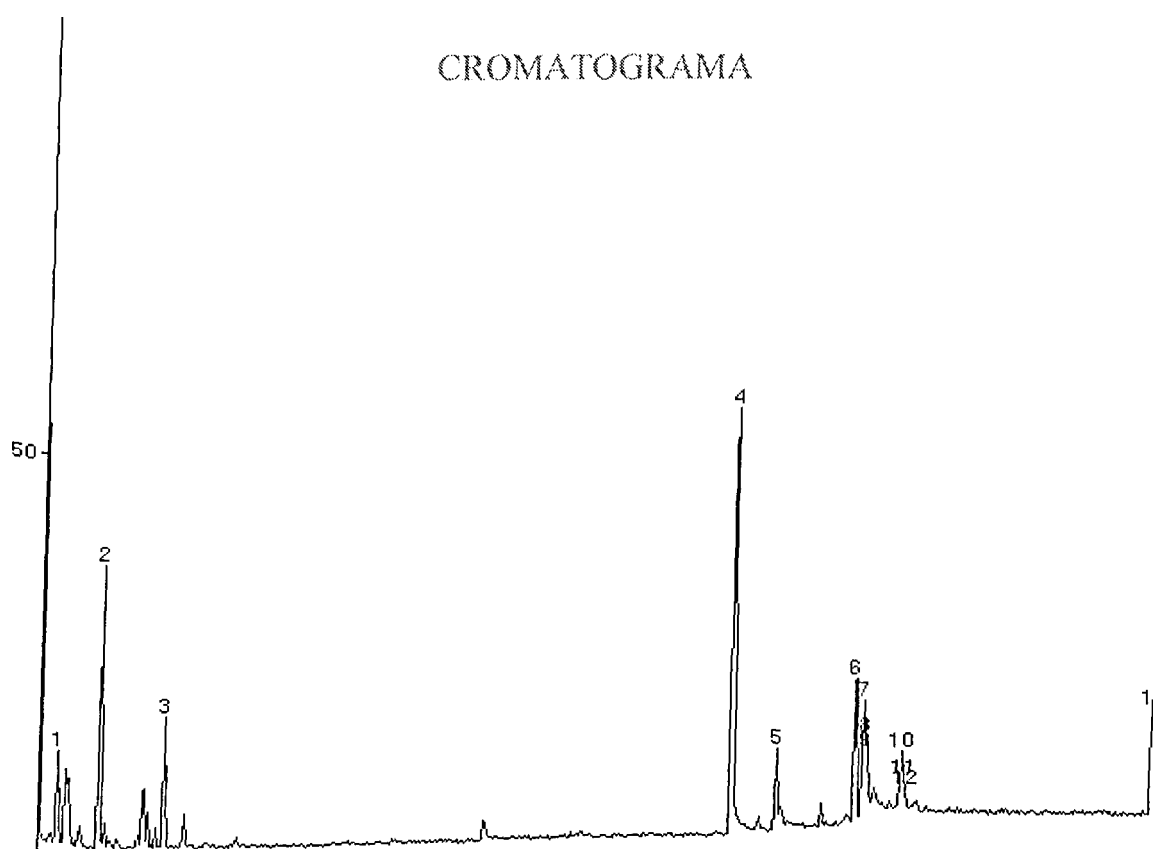
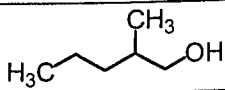
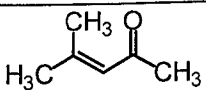
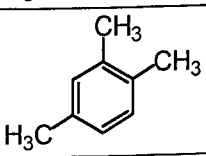
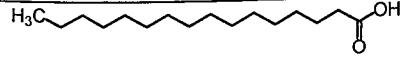
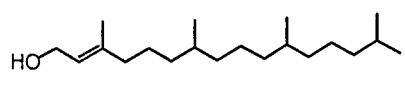
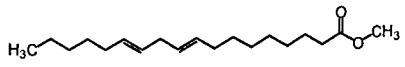
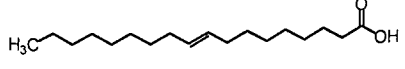


Figura 13. Cromatograma do extrato diclorometano/clorofórmio (1:1, v/v)

Na tabela 5 são mostrados a porcentagem dos compostos identificados, na subfração diclorometano/ clorofórmio (1:1), suas estruturas com seus respectivos nomes.

As identificações estruturais destes compostos do extrato estão representadas através dos espectros de massas indicados nas figuras 14 a 21.

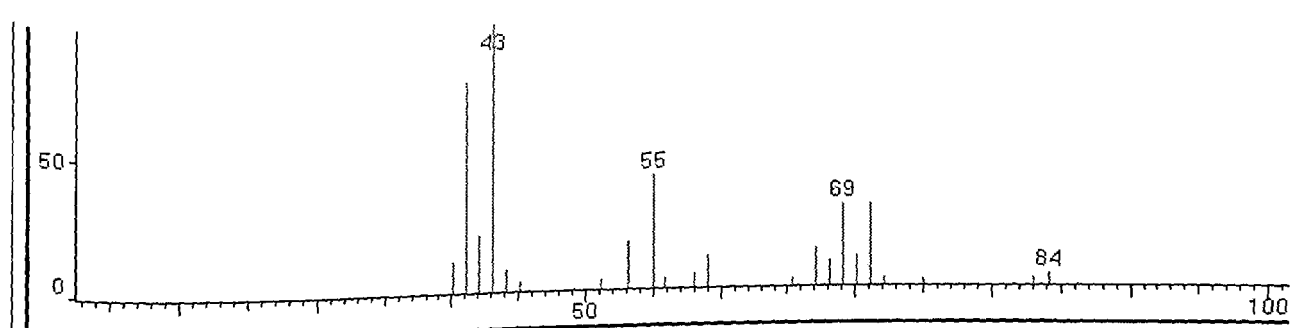
Tabela 5. Compostos identificados na subfração diclorometano-clorofórmio 1:1.

PICO	ESTRUTURA	NOME USUAL	TEMPO RETENÇÃO (min)	PICO (%)
1		2-metilpentan-1-ol	4,35	6.39
2		4-metilpent-3-en-2-ona	7,13	20.89
3		1,2,4-trimetilbenzeno	11,44	13.30
5		Ácido hexadecanóico "Ácido palmítico"	52,40	10.73
6		(E)-3,7,11,15- tetrametilexadec-2-en-1- ol "Trans-fitol"	57,60	22.16
7		(9E,12E)- octadeca-9,12- dienoato de metila "Linoleato metila"	58,17	17.59
8		Ácido (E)-octadec-9- enóico "Ácido oleico"	58,31	8.94

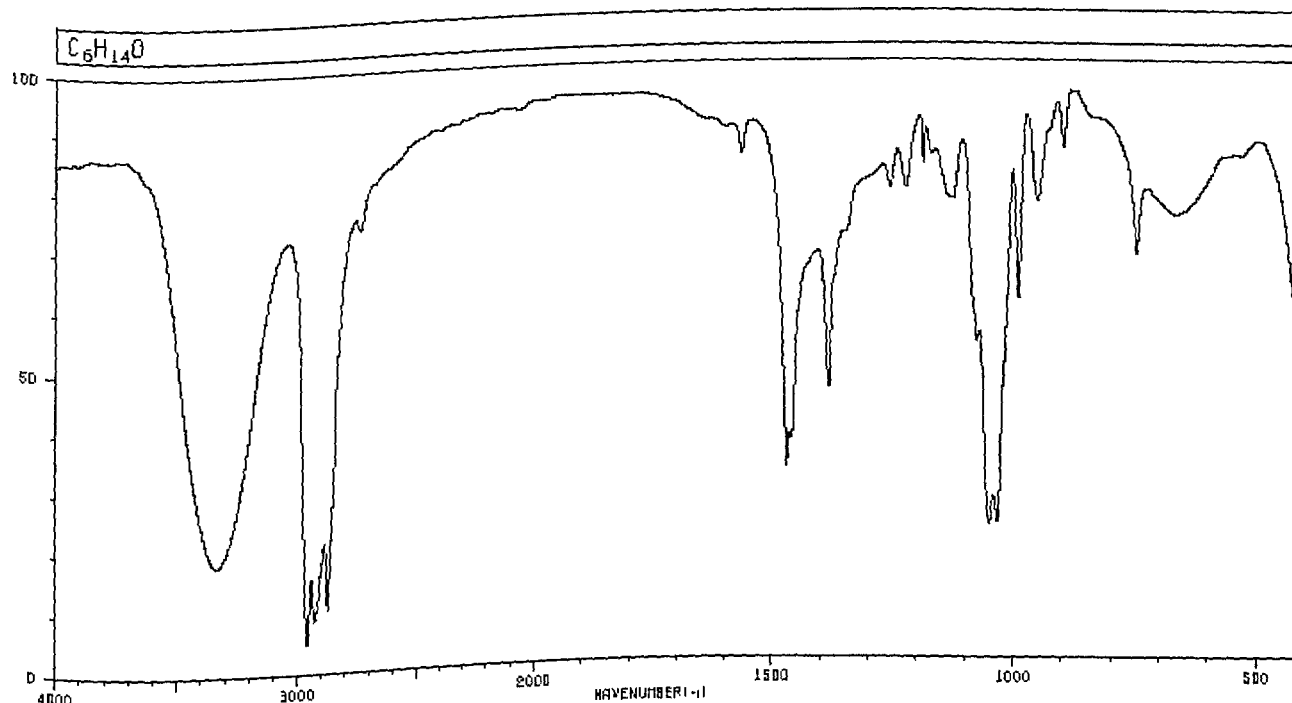
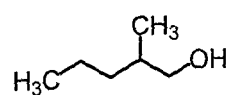
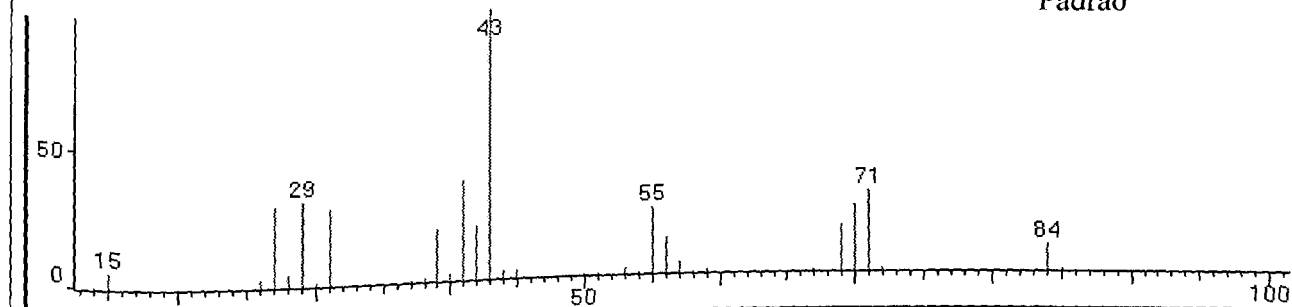
O pico 4 mostra a presença significativa do composto isobutil Ftalato. Proveniente de parafilme utilizado para vedar as colunas cromatográficas no procedimento de obtenção das frações e subfrações do extrato. Não foi possível identificar os picos 9, 10, 11,12 e 13 com a biblioteca do aparelho CG-EM utilizado.

2-metilpentan-1-ol

Amostra (Pico 1)



Padrão



3335	17	1458	35	1070	60	665	70
2958	4	1380	43	1046	21		
2930	6	1250	74	1030	21		
2874	10	1217	74	999	57		
2733	70	1181	79	942	74		
1551	81	1128	74	889	61		
1458	30	1120	74	740	64		

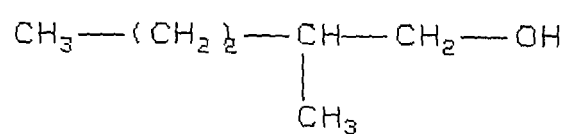
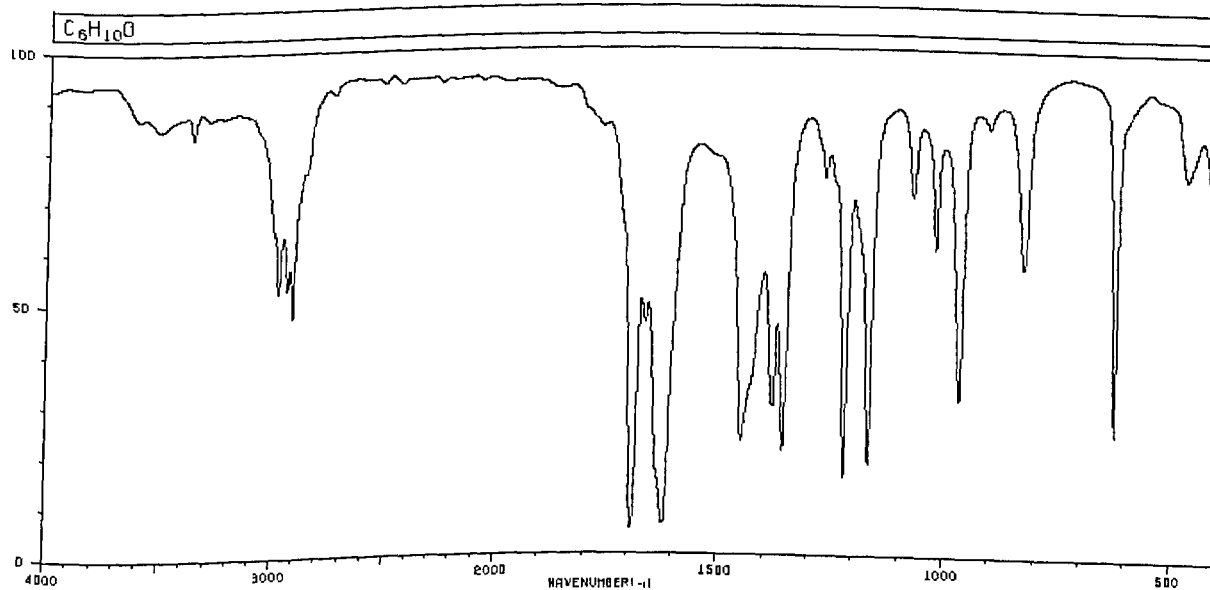
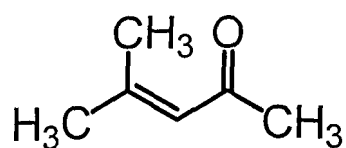
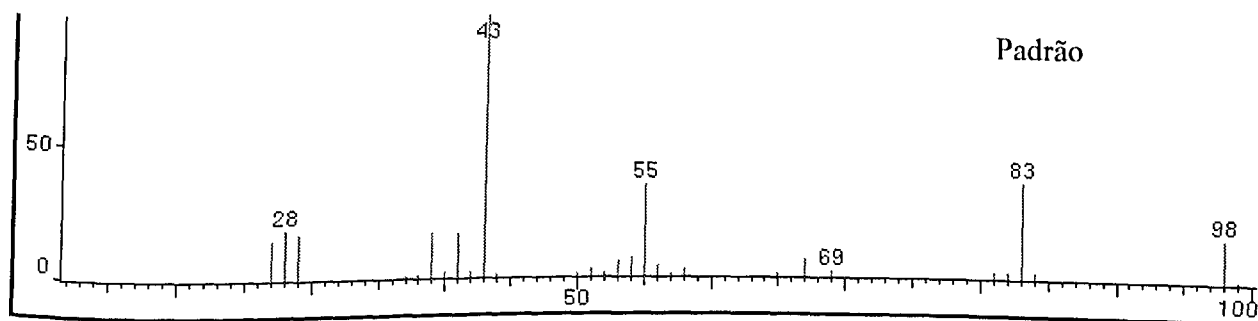
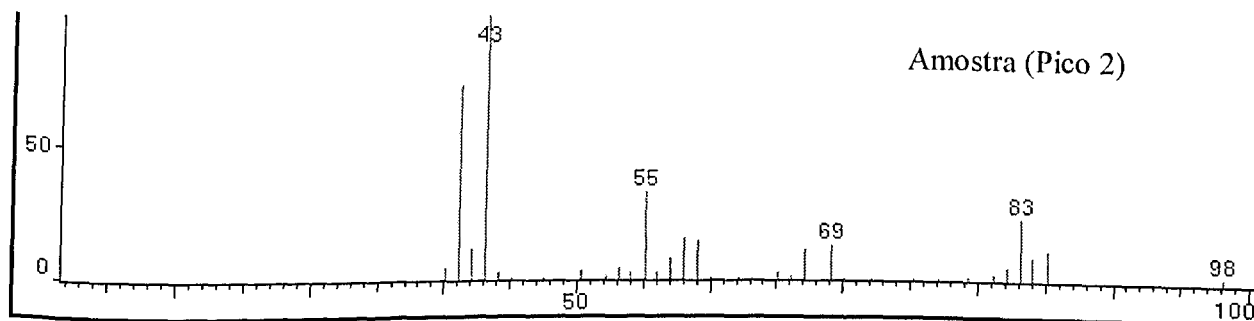


Figura 14. Espectro de massas e IVTF do 2-metilpentan-1-ol.

4-metilpent-3-en-2-ona



3516	81	1620	6	1069	68	463	72
3369	79	1449	21	1019	58		
2978	50	1379	27	965	29		
2939	50	1368	19	907	81		
2915	46	1265	72	902	81		
1890	4	1220	14	823	55		
1662	43	1166	17	822	23		

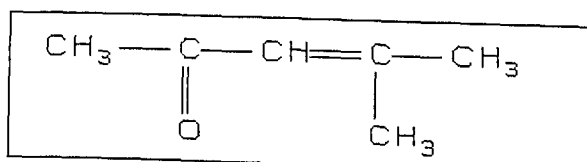
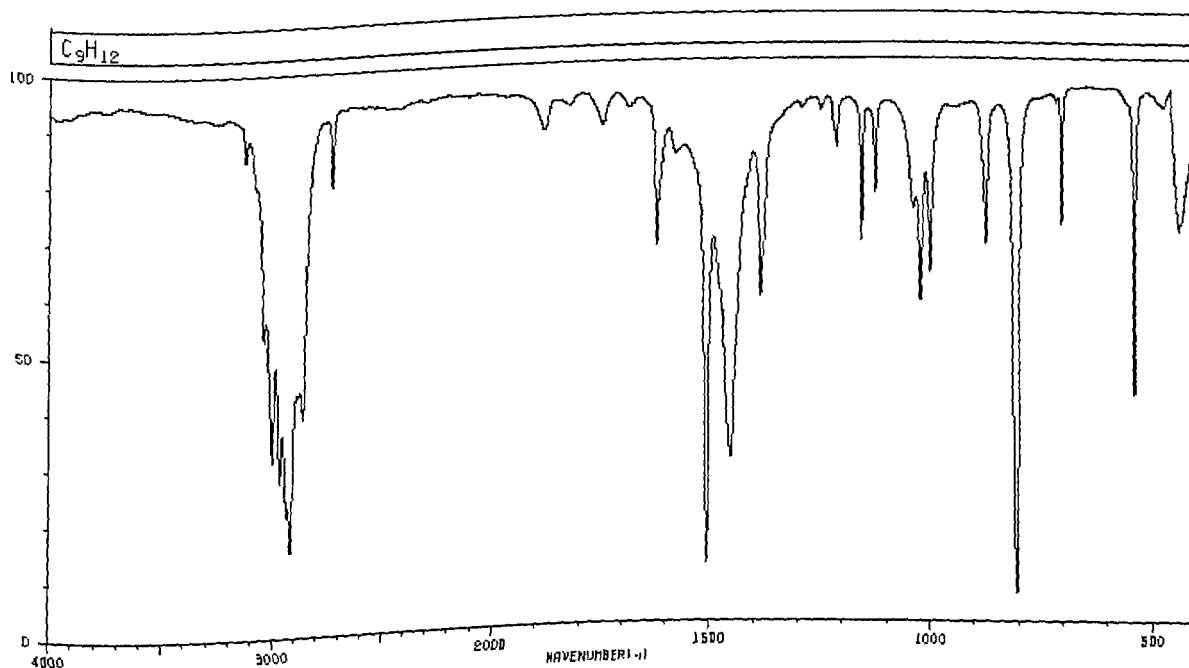
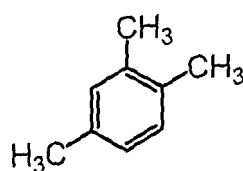
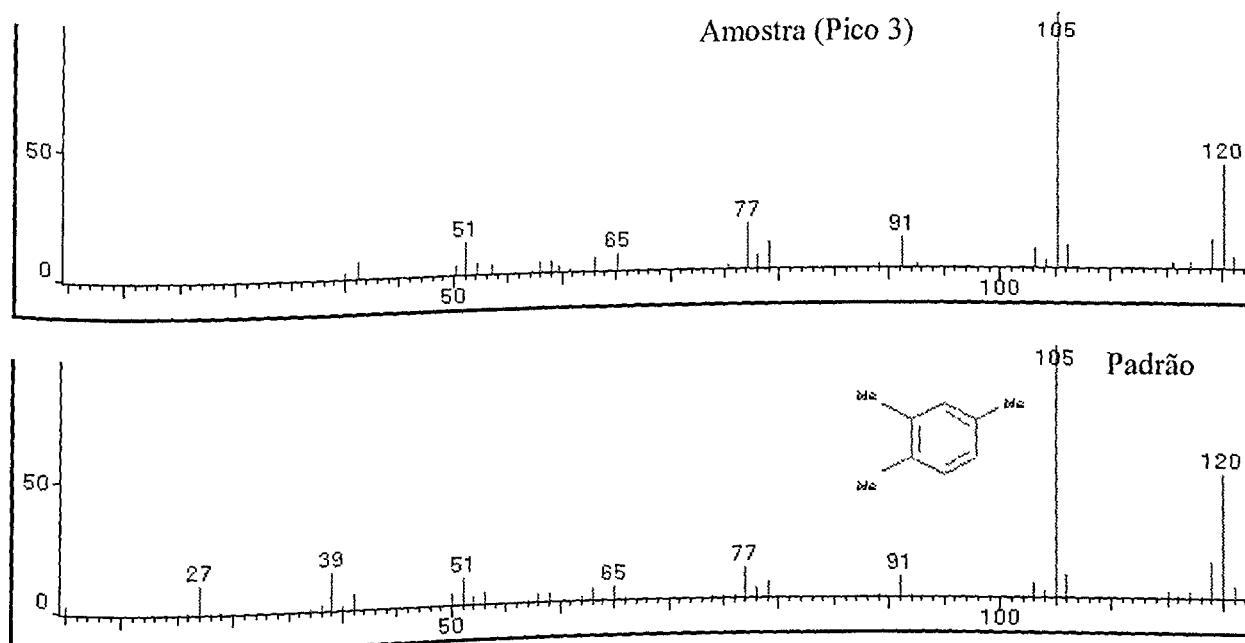


Figura 15. Espectro de massas e IVTF do 4-metilpent-3-en-2-ona.
1,2,4-trimetilbenzeno



3126	81	2730	77	1383	66	999	60
3041	50	1877	84	1217	84	874	64
3002	30	1743	64	1211	81	806	4
2970	26	1619	64	1166	64	703	68
2939	20	1578	79	1125	72	539	39
2922	14	1505	10	1038	70	440	66
2864	37	1461	27	1021	66		

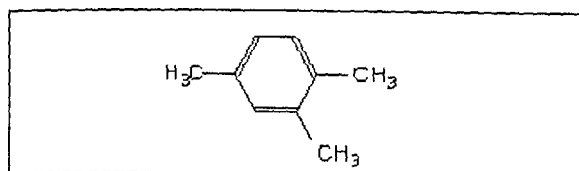
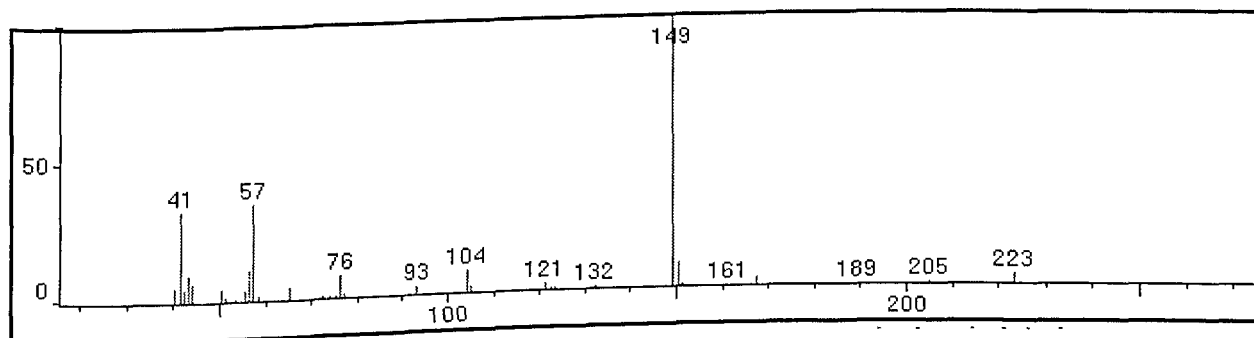


Figura 16. Espectro de massas e IVTF do 1,2,4-trimetilbenzeno.

Amostra (Pico 4)

Isobutil ftalato



Padrão

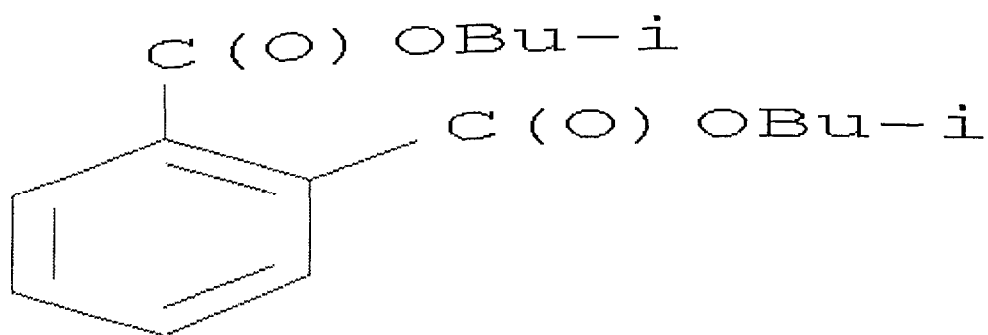
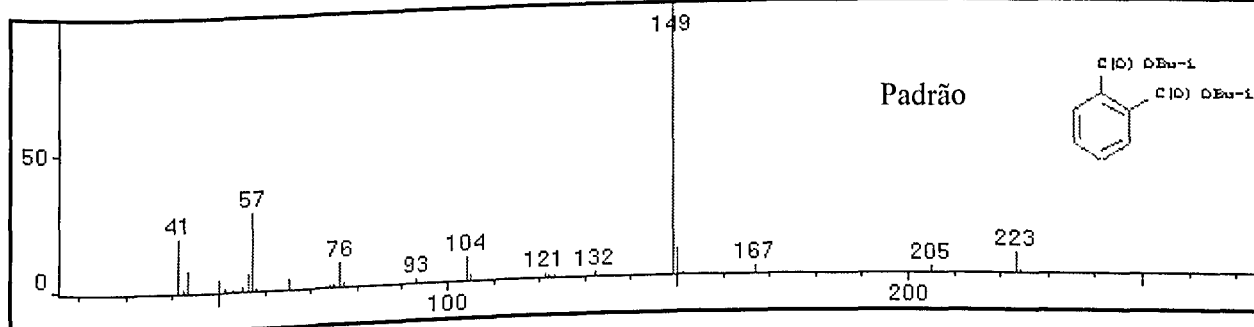
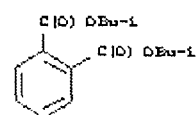
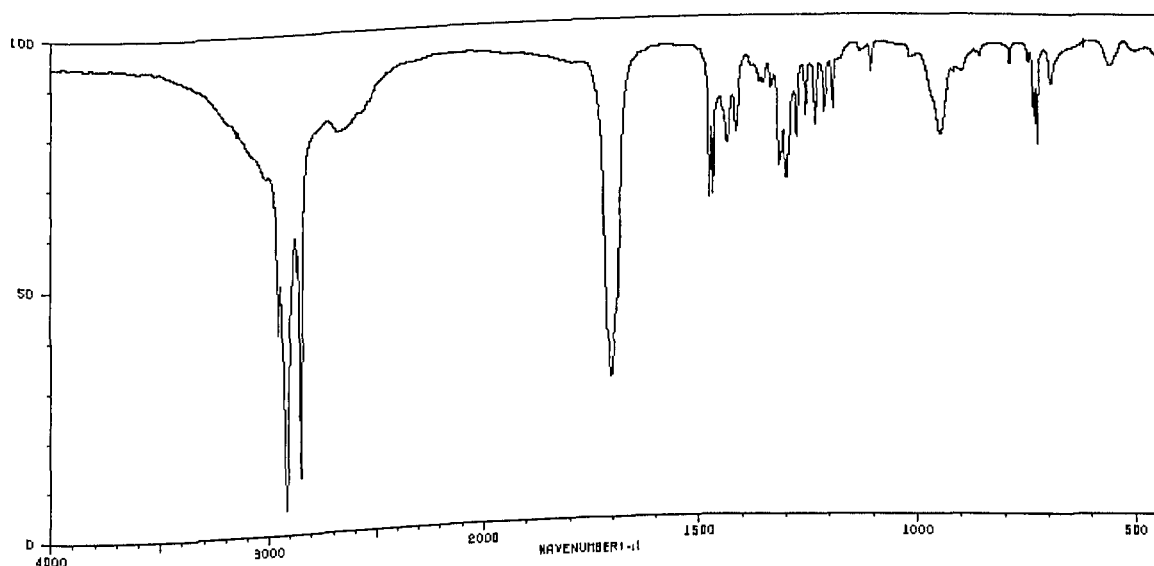
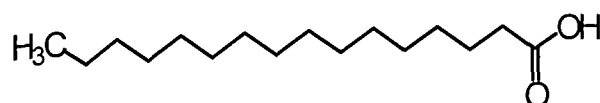
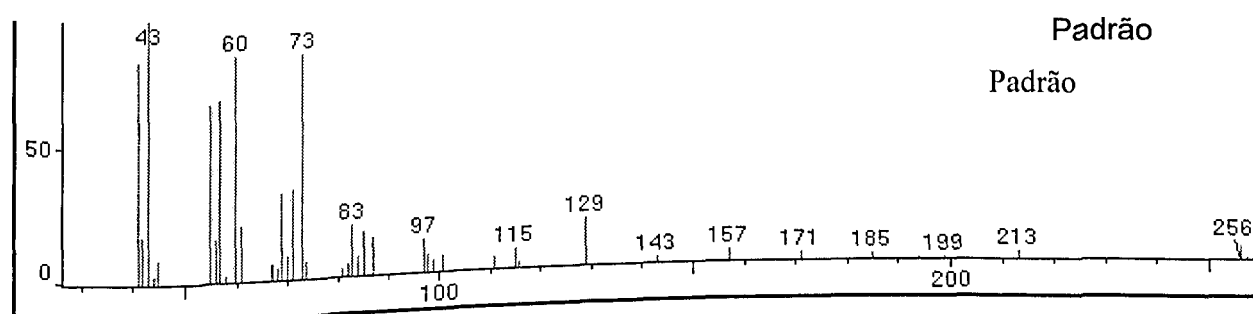
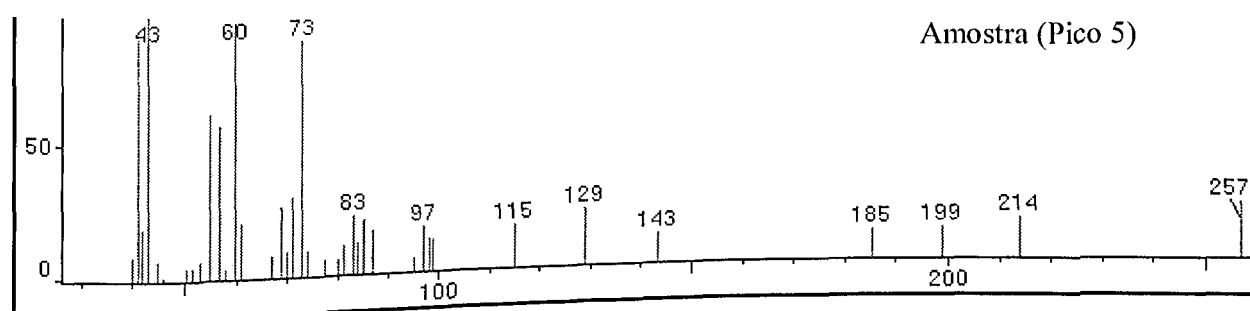


Figura 17. Espectro de massas e estrutura do isobutil ftalato

Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico).



2954	36	1702	26	1330	61	1168	79
2917	4	1471	60	1312	68	1099	84
2871	50	1454	62	1296	64	942	72
2850	10	1431	72	1272	72	729	77
2829	77	1411	74	1251	77	720	70
2869	77	1357	84	1229	74	608	81
2859	77	1348	84	1209	77	562	86

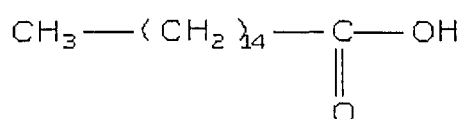
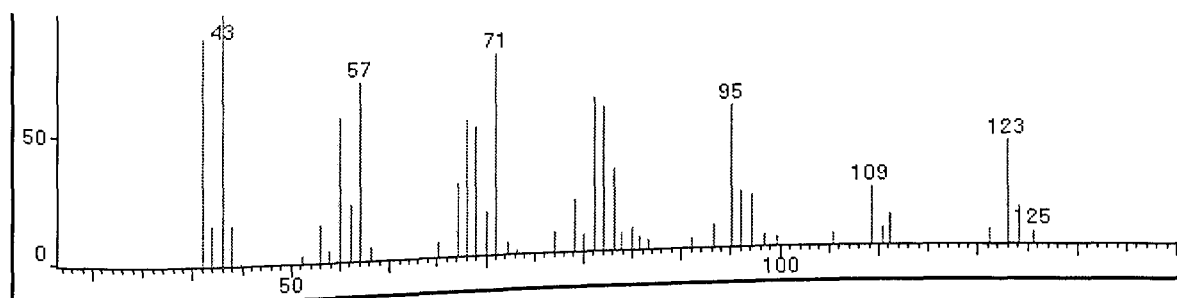


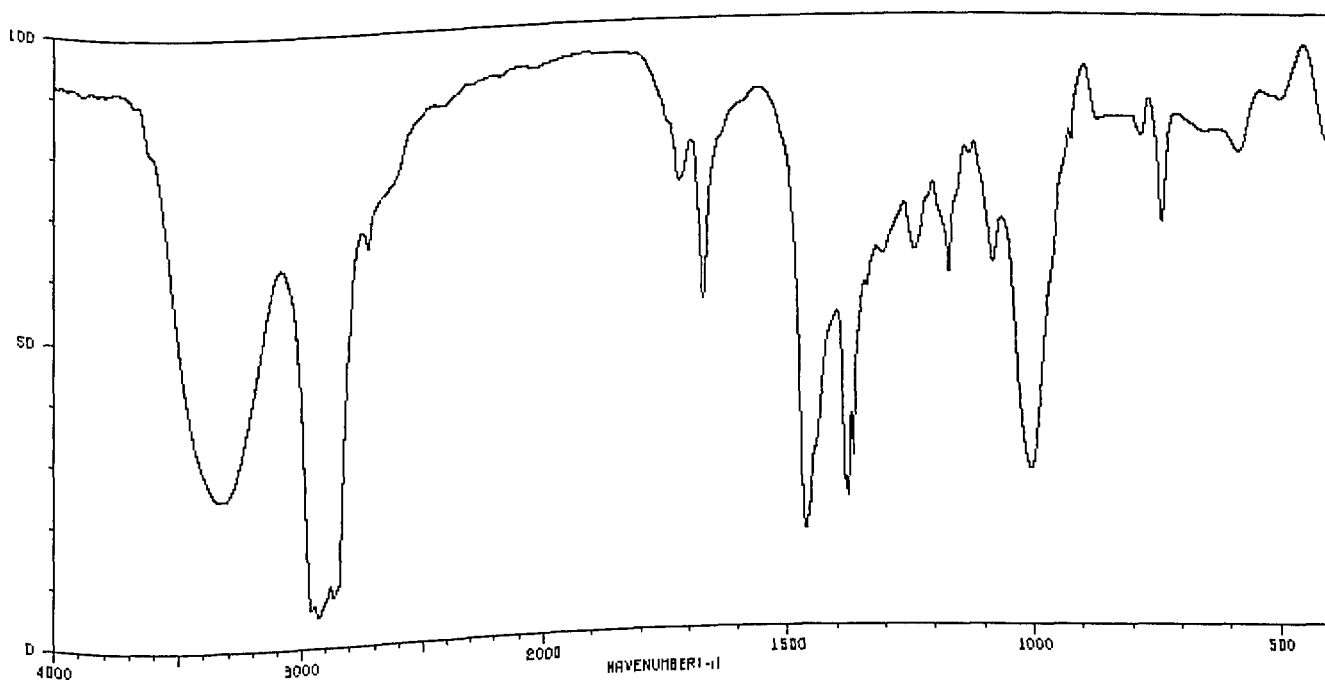
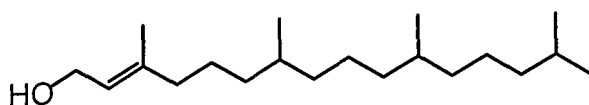
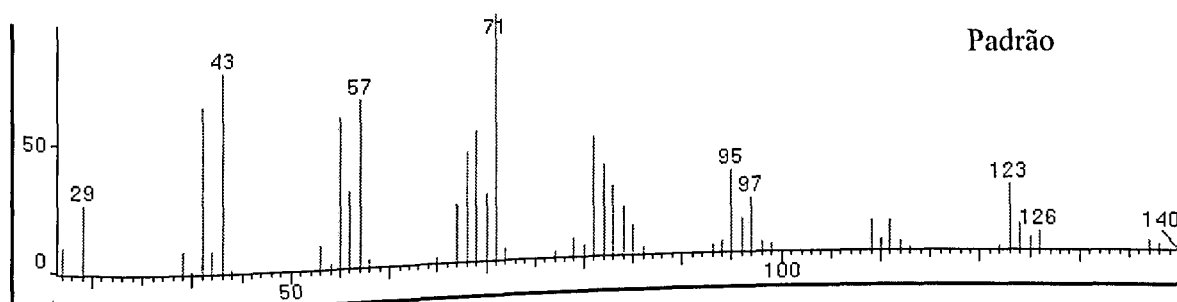
Figura 18. Espectro de massas e IVTF do ácido hexadecanóico (ácido palmítico).

(E)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (Trans-*fitol*)

Amostra (Pico 6)



Padrão



3333	23	1452	15	1081	57
3323	23	1383	22	1004	24
2927	4	1378	20	919	77
2870	7	1366	26	778	77
2723	62	1240	58	736	64
1719	70	1170	55	580	74
1669	62	1127	74		

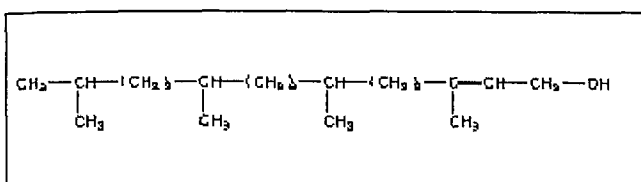
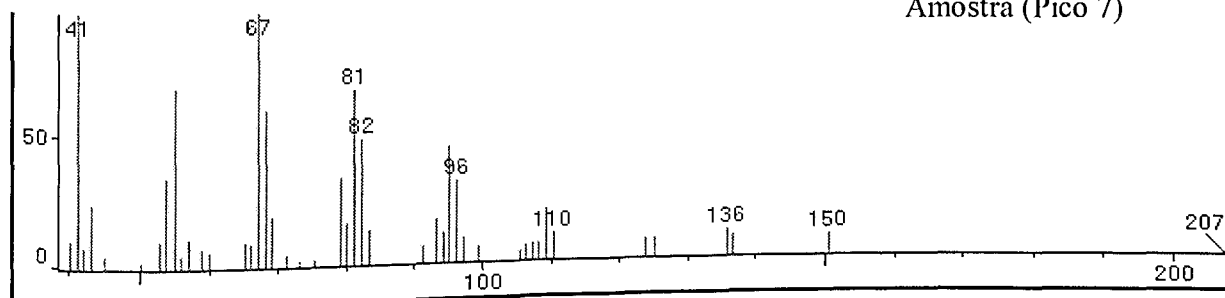


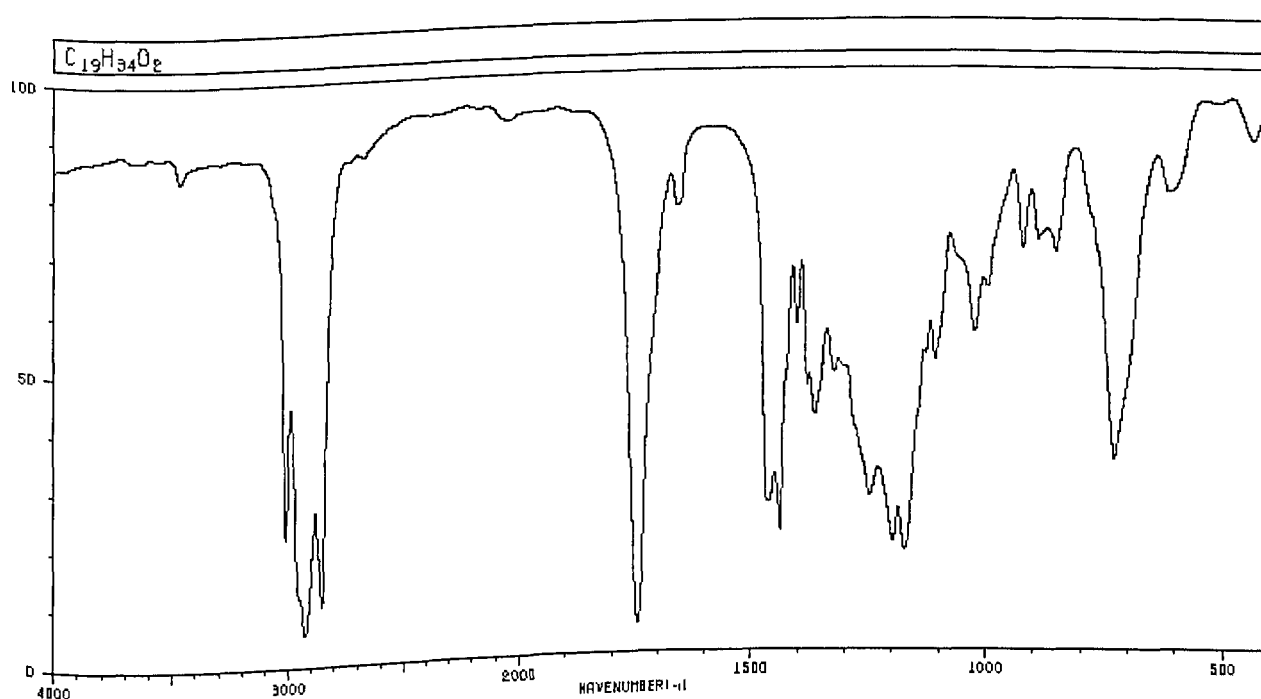
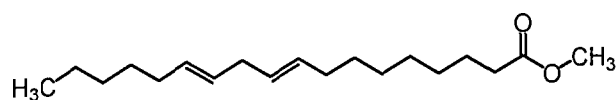
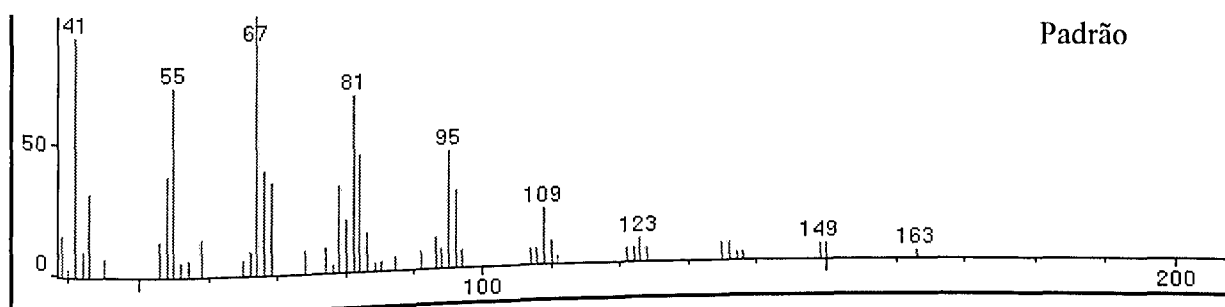
Figura 19. Espectro de massas e IVTF do (E)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (Trans-*fitol*).

(9E,12E)- octadeca-9,12-dienoato de metila – “Linoleato metila”

Amostra (Pico 7)



Padrão



3467	81	1466	24	1320	46	914	66
3010	21	1460	24	1245	25	881	68
2953	11	1449	29	1196	17	844	65
2928	5	1436	20	1172	16	726	31
2856	9	1398	53	1102	47	603	77
1744	4	1377	49	1016	52	597	77
1657	74	1362	38	989	60	426	84

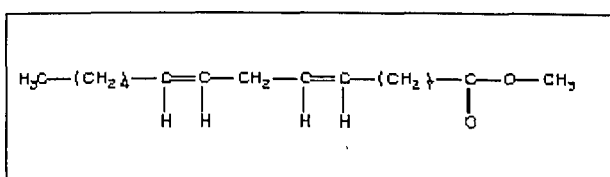
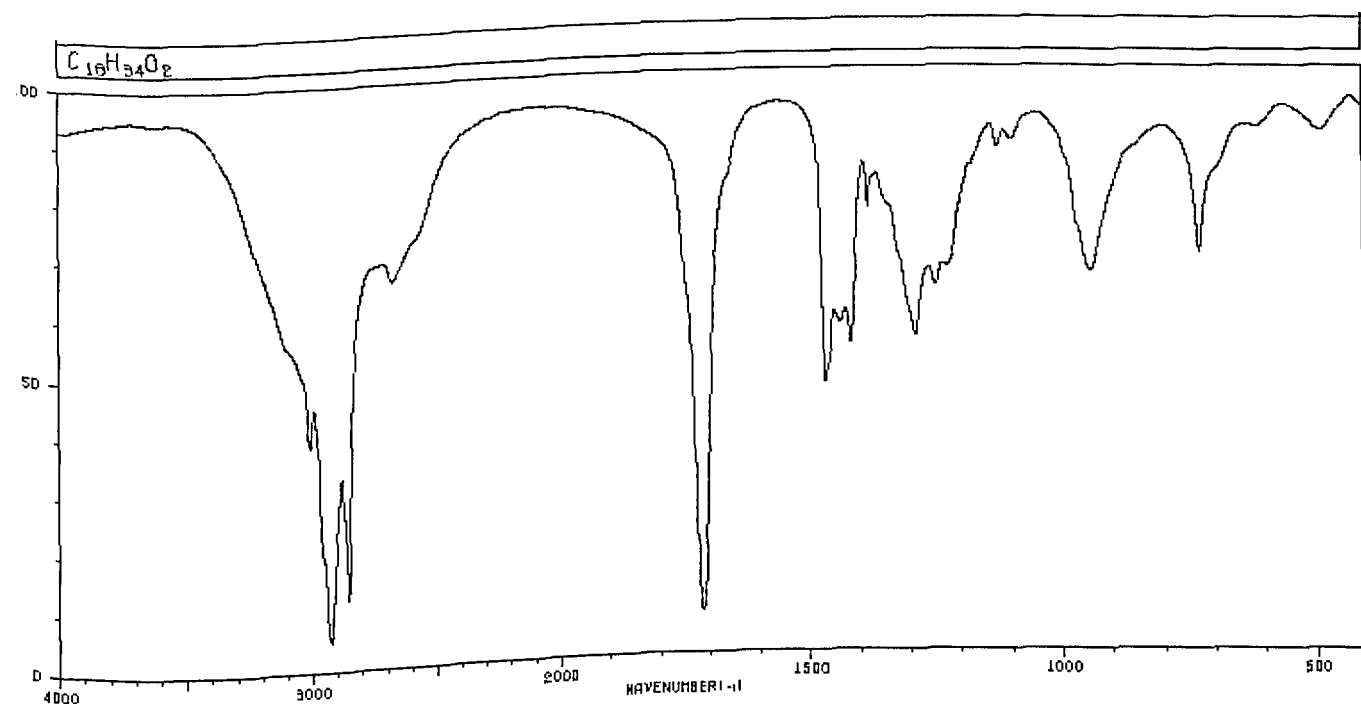
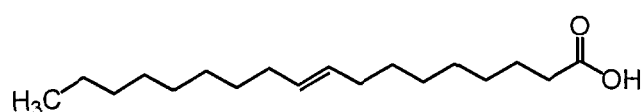
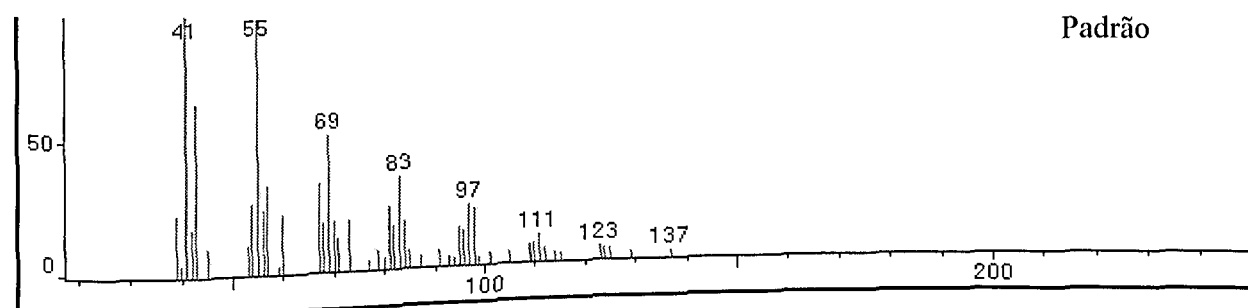
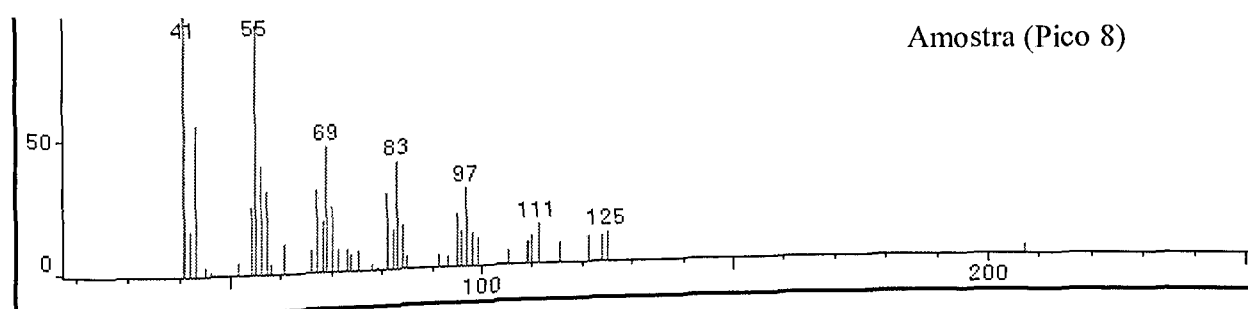


Figura 20. Espectro de massas e IVTF do (9E,12E)- octadeca-9,12-dienoato de metila – “Linoleato metila.

Ácido (E)-octadec-9-enóico – “Ácido oléico”.



3007	36	1436	63	938	62
2952	18	1413	50	723	64
2927	4	1378	72	482	86
2856	11	1286	62		
2874	64	1246	60		
1711	6	1119	81		
1467	44	1092	84		

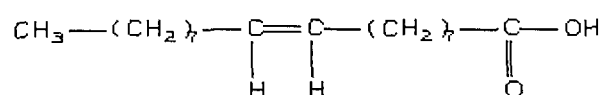


Figura 21. Espectro de massas e IVTF do Ácido (E)-octadec-9-enóico – “Ácido oléico”.

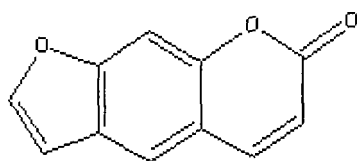
CONCLUSÃO

Através dos bioensaios de germinação realizados em placas de Petri e em casa de vegetação, foi possível verificar que o extrato metanólico do caule da sucupira branca possui potencial alelopático sobre o capim colônia.

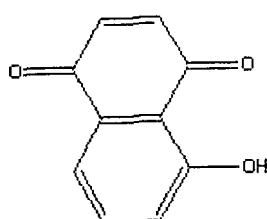
Com os resultados obtidos através dos bioensaios de germinação utilizando frações e subfrações deste extrato, foi possível verificar que o efeito alelopático fica menos evidenciado à medida que o extrato vai sendo fracionado, sugerindo que tais efeitos são resultantes de atividades sinérgicas entre os vários aleloquímicos do que da atividade de um aleloquímico isolado.

Na identificação espectrométrica da subfração mais ativa (diclorometano/ clorofórmio 1:1), levou a identificar os seguintes compostos: 2-metilpentan-1-ol, 4-metilpent-3-en-2-ona, 1, 2,4- trimetilbenzeno, Ácido hexadecanóico, (E)-3, 7, 11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienolato de metila e ácido (E)- octadec-9-enóico, como sendo os possíveis compostos responsáveis pela atividade inibitória.

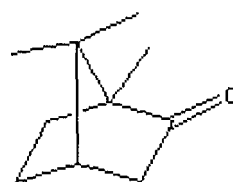
LISTA DE ESTRUTURAS



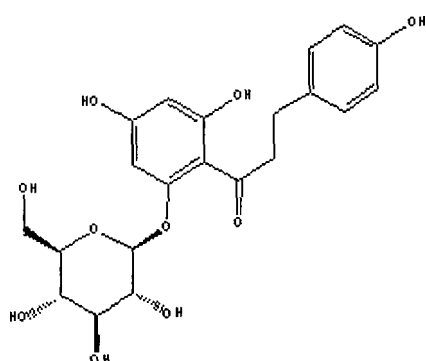
Psoraleno
Classe: Furanocumarina



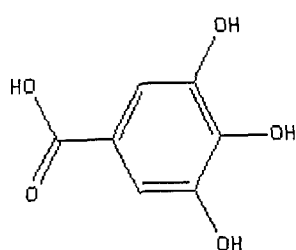
Juglona
Classe: Quinona



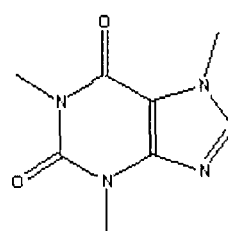
Cânfora
Classe: Monoterpeno



Phlorizin
Classe: Flavonóide

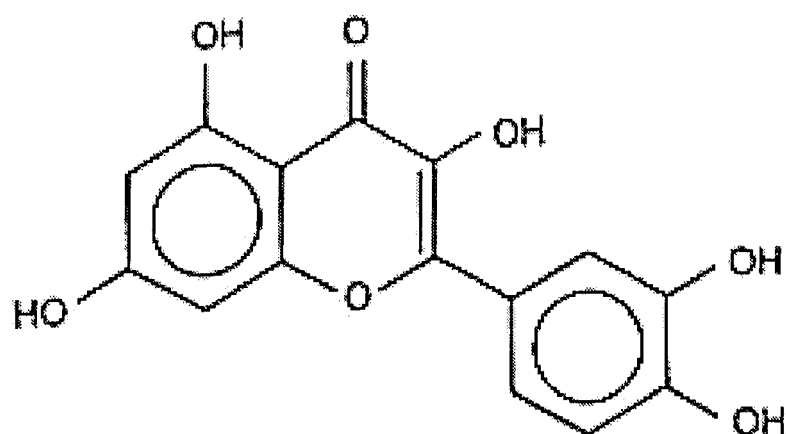


Ácido Gálico
Classe: Tanino

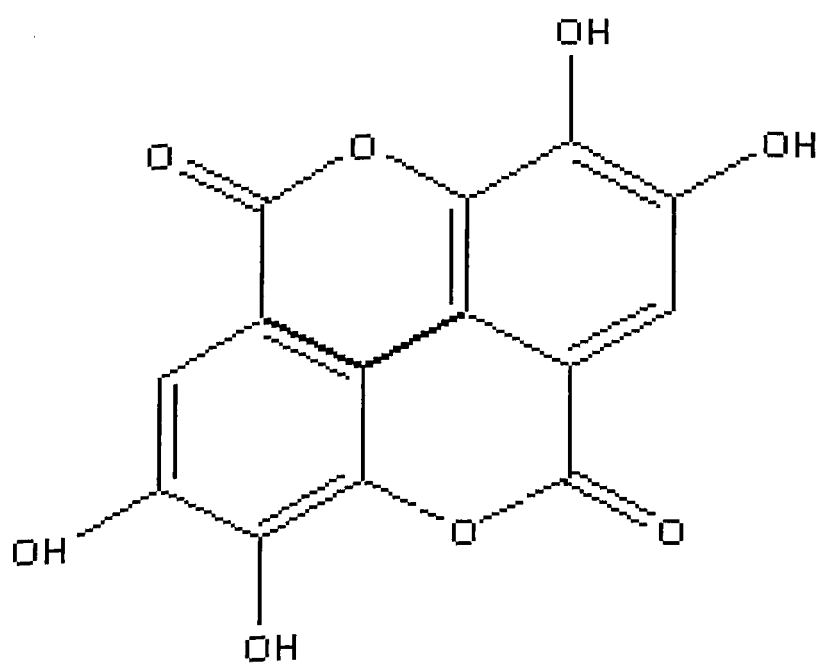


Cafeína
Classe: Alcalóide

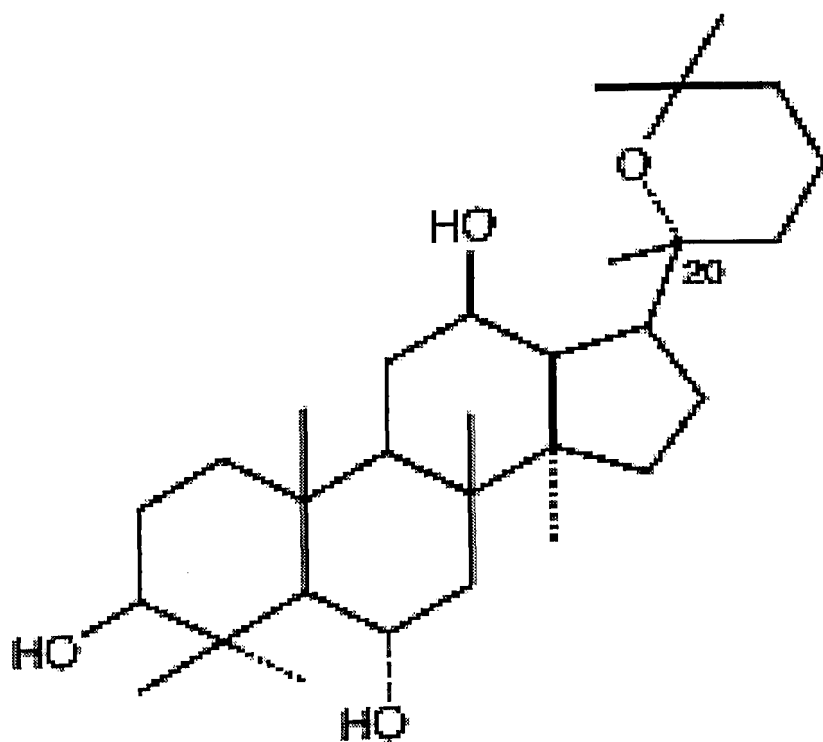
Quercetina
Classe Flavonóides



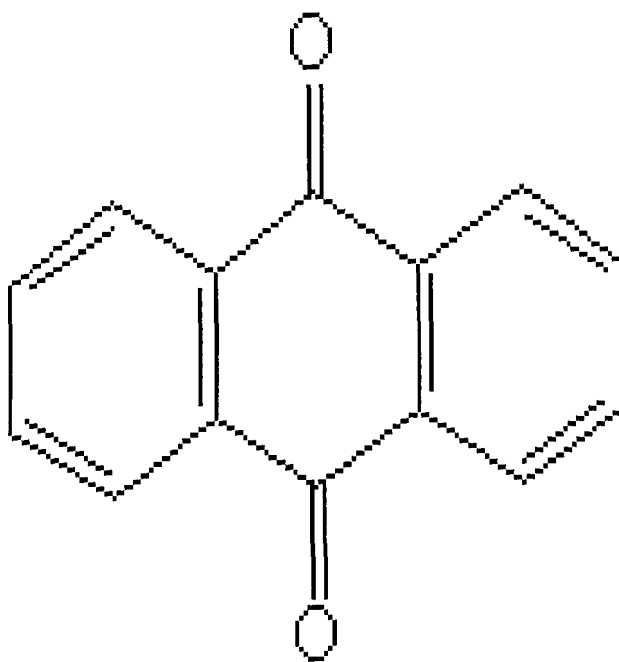
Acido Elágico
Casse Taninos



Panaxatriol
Classe Triterpenos



Antraquinona
Classe Quinonas



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.R.P. Efeito alelopático de espécies de *Brachiaria* Griseb. Sobre algumas leguminosas forrageiras tropicais. 1993. 73 p.
- ALMEIDA, F.S. A alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (circular, 53).
- ALMEIDA, F.S. Influência da cobertura morta na biologia do solo. A Granja, São Paulo, v.4, n. 451, p. 52-65, 1985.
- www.arvores.brasil.nom.br/florin.sucupi.htm. 31 de Março 2005.
- BARCIK, C. Processos autoalelopáticos na cultura de alfafa (*Medicago sativa* L.). Variedade crioula em solos de diferentes texturas. 1999.109p. (dissertação de mestrado em ciências do solo)- Curitiba.
- BLUM, U. (1998) " Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions" J. Chem. Ecol. 24(2), 685-708.
- BLUM, U.(1995) "The value of model plant-microbe-soil systems for understanding processes associated with allelopathic interaction.. ACS Symp Ser. 582,127-31.
- BLUM,U., WENWORTH, T.R., KLEIN,K., WORSHAM, A.D., KING, L. D., GEIG, T.M., Lyu, S. W.(1991) "Phenolic acid content of soil from wheat-no till; wheat- conventional till, and fallow-conventional till soybean cropping systems" J.Chem. Ecol. 17, 1045-1067.
- BOUFALIS, A. and PELLISSIER, F.(1994)" Allelopathic effects of phenolic mixtures on respiration of two spruce mycorrhizal fungi" J.Chem. Ecol 20(9), 2283-2289.
- BUSS D Antony SHUGENG CAO, MARK S. BUTLER. Flavonoids from *Artocarpus ianceifolius* Roxb. Natural Product Research 2003, 17, 79-81.
- CALDIZ, D.O. and FERNÁNDEZ, L. V. (1999)" Allelopathy as Possible Strategy for weed control in Agriculture and Forestry Systems" Recent Advances in Allelopathy. Vol.I.A

CARDONA César, SEGENET, and SEGURA Gustavo. **Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume.** Plant Physiology and Biochemistry 42, Issue 11, 2004, 867-873.

DAYAN, F.E., ROMAGNI, J. G., and DUKE, S. O 2000. **Investigating the mode of action of natural phytotoxins.** J. Chem Ecol. 26:2079-2094.

DEL MORAL, R. **On the variability of chlorogenic acid concentration.** Oecologia, v.9, p.289-300, 1972

WWW.editora. UFLA.br/Boletim/ Pdf/bol-54-Pdf. 31 de Março 2005.

EINHELLIG, F. A. **Physiology and mechanisms of action in allelopathy.** In: FRIST WORD CONGRESS ON ALLELOPATHY, Cádiz – Spain, 1996. Anais...Cádiz – Sapin, 1996. p.139.

EINHELLIG, F.A . **Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 5, Lavras. Anais...Lavras: UFLA, 1995. p.59-74.

EINHELLIG, F.A. **Allelopathy: a natural protection, allelochemicals.** CRC Handbook of pesticides: methods. Boca Raton, CRC Press, 1985. v.1. p.161-2000.

EINHELLIG, F.A. **Mechanisms and modes of action of allelochemicals.** In PUTNAM, A.R & TANG, C.S. (ed) **The science of allelopathy.** 1ª ed. New York, 1986, p. 171-188.

EINHELLIG, F.A., MUTH, M.S., and SCHON, M.K. (1995) **" Effects of allelochemicals on plant-water relationships"** ACS Symp. Ser. 168, 179-195.

EINHELLIG, F.A., RASMUSSEN, J.A., HEJL, A. M. and SOUZA, I.F.(1993) **" Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis"** J.Chem. Ecol. 19, 369-375.

ELIO, G.W.M. SCHIJLEN, C.H.RIC E VOS, ARJEN J. VAN TUNEN and ARNAUD G. BOVY **Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants.** Phytochemistry 65. Issue 19. 2004, 2631 – 2648.

FEENY, P.P. **Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feedings by winter moth caterpillars.** Ecology, 51: 565-81,1970.

- GRANKHOV, V.P. ; DIDYK, N.P. **Phytocenotics approach in allelopathy of higher plants.** In: FIST WORLD CONDRESS ON ALLELOPATHY, Cádiz – Sapin, 1996. Anais...Cádiz – Spain, 1996. p.52.
- HALL, David Oakley. **Fotossíntese** / D .O.Hall, K. K. Rao ; [Tradução e notas de Antonio Lamberti]. – São Paulo : EPU : Ed Universidade de São Paulo, 1980. (Temas de Biologia ; v. 10)
- KASPERBAUER, M.J.;TSO, T.C., SOROKIN, T.P. **Effects of end-of-day red and far-red radiation on free sugars, organic acids and aminoacids of tobacco.** *Phytochem.*, v.9, p.2091-2095,1970.
- KAWAHARA N., INOUE M., KAWAI K.-I, SEKITA S., SATAKE M., GODA Y. **Diterpenoid from *Salvia greggii*.** *Phytochemistry*, August 2003, vol.63,no. 8. pp 859-862(4) Publisher: Elsevier Science.
- LADYZHENSACKAYA. E.P., GRIKUM, I. N., KORABLEVA.N.P. and MOROZ, P. A. (1987)” **Effect of phenolic compounds on the ATPase activity of plant plasmalemma fraction**” *Dokl. Akad. Nauk Ukr. SSR, Ser. B: Geol., Khim. Biol. Nauki* 6,66-69.
- LOVETT, J.V. **Allelopathic and self-defence in plants.** *Australian Weed Control Handbook*, Port Melbourne, v.2, n.1, p.33-36,1982.
- M.M. E VIDAL, R. A. **Potencial de utilização de cobertura vegetal de sorgo e milho na supressão de plantas daninhas em condições de campo: II- Efeitos da cobertura Mortatrezzi.** Volume 22.1:1-10, 2004.
- MACÍAS, F. A., GALINDO, J .C .G., MASSAANET, G. M. (1992) “ **Natural Products as Allelochemicals. I. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models**” *Phytochemistry* 31, 1969-1977.
- MANTHE, B., SEHULZ, M SCHNABL. H. (1992) “ **Effect of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba L.*; evidence for salicylic acid metabolism**” *J. Chem. Ecol.* 18(9), 1525-1539.
- MITIDIERI, José, 1983 – **Manual de gramíneas e leguminosas para pastos tropicais** / José Mitidieri. – São Paulo:
- MULLER, C. H (1969)- **Allelopathy as a factor in ecological process.** *Vegetatio* 18: 348-357.

NASCIMENTO I. R., LOPES L. M. X. **Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*.** *Phytochemistry*, 2003, 63(8): 953-957.

NEAVE, I. A. and DAWSON, J. O (1989) “ **Juglone reduces growth nitrogenase activity, and root respiration of actinorhizal black alder seedlings**” *J. Chem. Ecol* 15(6): 1823-1826

PUTNAM, A.R.: DUKE, W.D. **Biological suppression of weeds: evidence for allelopathy in accessions of cucumber.** *Science*, 185: 370-2, 1974

PUTNAM, A.R.: DUKE, W.D. **Allelopathy in agroecosystems.** *Annual Review of Phytopathology*, v.16, p.431-451, 1978.

PUTNAM, A.R. **Weed allelopathy.** In: **WEED physiology.** Boca Raton: CRC Press, 1985. p.131-155

RICE, E.L. **Allelopathy.** 2 ed. New York. Academic, 1984. 422 p.

RODRIGUES, L. R. A. RODRIGUES, T.J.D; REIS, R. A. **Alelopatia em plantas forrageiras.** Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1992. 18 p. Boletim.

RODRIGUES, L.R.A.; ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D. **Alelopatia em forrageiras e pastagem.** In: **Simpósio sobre Ecossistema de pastagem**, 2, 1993 Jaboticabal. Anais...Jaboticabal: FUNEP, 1993. p. 100-129.

WWW.sementesoesp.com.br/show.gramíneas.php?id=14 31 de Março 2005.

SOUZA, I.F. **Alelopatia de plantas daninhas.** *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.13, n. 150, p.75-78, 1988.

SWAIN, T. **Secondary compounds as protective agents.** *Annual Review of Plant Physiology*, 28:479-501, 1977.

TANG, C. S., CAI, W. F., KOHL, K. and NISHIMOTO, R. K. (1995) “ **Plant stress and Allelopathy**” In” **Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications**” (Inderjit, K. M.M., Dakshini, and Einhellig, F. A., Eds) *Acs Symp. Ser.* 582, 142-157

WWW.UFV.br/dbv/pgfvg/Foto12.htm-71k. 31 de Março 2005.

TUKEY Jr., H.B. **The leaching of substances from plants.** American Review of Plant Physiology, 21: 305, 1970.

WHATLEY; **A luz e a vida das plantas/** Jean M. Whatkey, Frederick R. Whatley ; [tradução Gil Martins Felipe] . – São Paulo. Ed. Da Universidade de São Paulo, 1982. (Temas de Biologia; v.30).

WILSON, E.O. **Chemical communications within animal species.** In: SONDHEIMER, E. & SIMEONE, J.B. **Chemical Ecology.** New York, Academic, 1970. p.133-135.