



**Universidade Federal de Uberlândia**

**Instituto de Química**

SISBI/UFU



1000218901

M011  
54  
F9512  
TES/MEM

**Estudos do potencial herbicida dos extratos metanólicos do caule e de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira preta) sobre a atividade da clorofila e sobre a germinação de sementes.**

**Cléia Regina Fuchs**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Terezinha de Farias Furtado**

**Uberlândia –MG**

*Abril de 2004*



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Química  
e-mail: [cpgquimica@ufu.br](mailto:cpgquimica@ufu.br)  
Fone: 3239-4385 – Fax: 3239-4208

---

**ALUNA: CLEIA REGINA FUCHS**

**NÚMERO DE MATRÍCULA: 5002402-4**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA INORGÂNICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA :NÍVEL MESTRADO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

*“Estudo do potencial herbicida do extrato metanólico do caule e de folhas de Myracrodruon urundeuva Fr. All. (aroeira preta) sobre a atividade da clorofila e sobre a germinação de sementes”.*

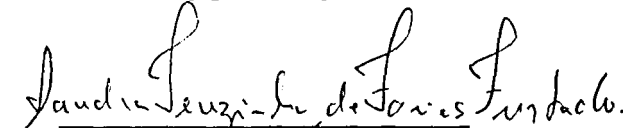
**ORIENTADORA: PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. SANDRA TEREZINHA DE FARIAS FURTADO**

A Dissertação foi APROVADA em reunião pública realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica, em 05 de abril de 2004 às 13:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

**NOME:**

**ASSINATURA:**

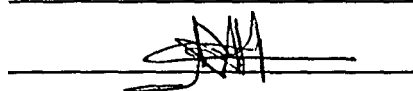
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra T. de Farias Furtado (IQ/UFU)



Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira (IQ/UFU)



Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho (IQ/UFG)



Uberlândia, 05 de abril de 2004.

*Senhor! Tu me cercas por trás e por diante  
E sobre mim pões a mão.  
Tal conhecimento é maravilhoso demais para mim.  
É sobremodo elevado, não o posso atingir.  
(salmo 139)*

*Aos meus pais:*

*Belmiro Fuchs e  
Maria da Luz Mendes Fuchs (in memoriam)*

# Agradecimentos

- . À Deus
- . À Profª. Drª. Sandra Terezinha de Farias Furtado, pelo incentivo, dedicação e confiança.
- . Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira.
- . Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola.
- . Ao Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho, (UFG).
- . Ao prof. Dr. Antônio Eduardo H. Machado e seus alunos orientandos, por cederem materiais e laboratórios para nossa pesquisa.
- . À Isabel, secretária do Instituto.
- . Aos técnicos de laboratório.
- . Ao aluno Jacques de Miranda pela colaboração .
- . Ao agricultor Jerônimo Freitas de Paula e sua esposa Sílvia Rosa Oliveira de Paula, da fazenda São José, município de Uberaba, por nos ter recebido e nos acompanhado na coleta da planta aroeira preta.
- . À Adriane Petronilha Macedo (*in memoriam*), amiga e companheira de luta.
- . À Jane Ferreira Neves Carrijo, pela ajuda e incentivo.
- . À direção do CEFET-Uberaba que me liberou de minhas atividades para a realização deste curso.
- . À toda a minha família pela paciência, colaboração e incentivo.
- . À todos os meus amigos.
- . Ao CNPq, pela aprovação do projeto “Estudos da Atividade Herbicida de Plantas Obtidas do Cerrado Brasileiro”, processo nº 400194/99-6, dentro do Programa Centro-Oeste/PCOPPG.

### Resumo

Os extratos das folhas e caule da planta *Myracrodruon urundeuva* Fr All. (aroeira preta) foram estudados quanto a sua ação sobre a atividade da clorofila e sobre as germinações de plantas daninhas e culturas.

Os estudos sobre as germinações foram realizados com as culturas *Oriza sativa* L. (arroz), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Glycine max* L. (soja) e com as plantas daninhas *Portulaca oleracea* L. (beldroega), e *Brachiária brizantha* (braquiária). O extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. inibe a germinação da braquiária na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sem afetar a germinação das culturas, podendo, portanto, ser utilizado nesta concentração para o combate da germinação da braquiária nas plantações de soja, feijão e arroz. O extrato do caule inibiu a germinação da soja e estimulou a germinação do feijão. Portanto, o extrato do caule não deve ser usado como inibidor da germinação de plantas daninhas, uma vez que ele não apresentou efeito sobre as mesmas.

A atividade da clorofila foi estudada observando-se a fluorescência da clorofila de cloroplastos extraídos de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) e a fotorredução do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP).

Os resultados sobre a fluorescência mostram que os extratos de folhas e de caule provocam alteração no rendimento quântico de fluorescência da clorofila. A desativação do acceptor de elétrons do meio reacional pode estar seguindo na presença dos extratos, dois caminhos, a saber: 1º) supressão por desativação de estados excitados, onde a energia pode estar sendo dissipada na forma de calor (extrato da folha) e 2º) emissão de luz aumentando o rendimento quântico (extrato do caule).

Os testes sobre a fotorredução do DCPIP mostram claramente que os extratos de folhas e do caule bloqueiam a transferência de elétrons da clorofila para o DCPIP, em todas as concentrações testadas, diminuindo a atividade da clorofila em de mais de 50%, no caso do extrato de folhas. O extrato do caule também inibe essa transferência de elétrons, mas em menor proporção que o de folhas, não atingindo o valor de 50% em nenhuma das concentrações utilizadas.

Isto mostra que os extratos de folhas e caule da planta *Myracrodruon urundeuva* Fr All. (aroeira preta) podem atuar como um potencial herbicida atuando no fotossistema II.

### Abstract

The leaves and stalk extracts of the *Myracrodruon plant urundeuva* Fr All. (black aroeira) were studied with regard its action on the chlorophyll activity and germination of damage plants and cultures.

The studies on the germinations had been carried through the cultures *Oriza sativa* L. (rice), *Phaseolus vulgaris* L. (beans), *Glycine max* L. (soybean) and with weed plants *Portulaca oleracea* L. (beldroega) and *Brachiaria brizantha* (braquiária). The leaf extract of *Myracrodruon urundeúva* Fr All. inhibits the germination of the braquiária in the concentration of  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  without affecting the germination of the cultures, being able to be used in this concentration for the combat of the germination of the braquiária in the crops of soy, bean and rice. The extract of stalk inhibited the germination of soy and stimulated the germination of beans. Therefore, the stalk extract cannot be used for inhibit the germination of damage plants, once it didn't present effect on the same ones.

The chlorophyll activity was studied observing chlorophyll fluorescence of extracted chloroplasts of spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) and the 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) photoreduction. The results on the fluorescence show that, the leaves and stalk extracts promote an alteration in the quantum yield of chlorophyll fluorescence. The deactivation of the electrons acceptor can be following, by two ways, to know: 1º) suppression for deactivation of excited states, where the energy, for example, can be wasted in the heat form (extract of the leaf), 2º) light emission increasing the quantum yield (extract of the stalk). DCPIP photoreduction show clearly that the leves extracts and stalk block the electron transference of chlorophyll for the DCPIP, in all the tested concentrations of the leaf extract, reduzing the chlorophyll activity more than 50%. The stalk extract also inhibits this transference of electrons, but in smaller proportion that of leaves, not reaching the value of 50% in none of the used concentrations.

The leaf and stalk extracts of the *Myracrodruon urundeuva* Fr All. (black aroeira) can act as a potential herbicide acting on photosystem II .

**ÍNDICE DE ASSUNTO**

<b>ASSUNTO</b>	<b>página</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>I</b>
<b>Resumo</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VI</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Herbicidas</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1 Tipos de herbicidas</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2 Ação dos herbicidas</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Fotossíntese</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1 O cloroplasto e as tilacóides</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2 Os sistemas antena e os centros de reação</b>	<b>12</b>
<b>2.2.3 Os fotossistemas I e II e a ATP-sintase</b>	<b>14</b>
<b>2.2.4 Reação de evolução de oxigênio</b>	<b>16</b>
<b>2.2.5 Reações no PSI, no PSII e esquema Z</b>	<b>16</b>
<b>2.2.6 Fotofosforilação não cíclica e fotofosforilação cíclica</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Alelopatia</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1 Natureza e produção dos aleloquímicos</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Funções dos aleloquímicos nos organismos, liberação no meio ambiente e mecanismo de ação</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Metodologias comumente utilizadas na literatura para avaliação do potencial alelopático de extratos de plantas</b>	<b>25</b>
<b>2.4.1 Preparação do extrato</b>	<b>25</b>
<b>2.4.2 Germinação</b>	<b>26</b>
<b>2.4.3 Avaliação da fotossíntese</b>	<b>26</b>
<b>a- Reação de Hill</b>	<b>26</b>
<b>2.4.4 Fluorescência da clorofila</b>	<b>28</b>



---

2.5 A planta <i>Myracrodruon urundeúva</i> Fr All. (arocira preta)	31
<b>3 Procedimentos Experimentais</b>	<b>33</b>
3.1 Preparação do extrato de <i>Myracrodruon urundeúva</i> Fr All.	34
3.2 Teste de germinação	34
3.3 Medidas de fluorescência estacionária	35
3.3.1 Preparação de membranas tilacóides fotossintéticas	35
3.3.2 Quantificação da clorofila	36
3.3.3 Medidas de fluorescência da clorofila	36
3.4 Medidas de fotorredução utilizando DCPIP	37
3.4.1 Preparo das suspensões de cloroplastos	37
3.4.2 Diluição das suspensões de cloroplastos	38
3.4.3 Preparo das misturas para a reação com DCPIP	38
3.4.4 Medida da Atividade da Reação de Hill	39
<b>4 Resultados e Discussões</b>	<b>41</b>
4.1 Pré-emergência (germinação)	42
4.1.1 Influência do extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeúva</i> Fr All. sobre culturas e plantas daninhas	42
4.1.2 Influência do extrato da folha de <i>Myracrodruon urundeúva</i> Fr All. sobre culturas e plantas daninhas	44
4.2 Medidas de Fluorescência estacionária	46
4.3 Medidas de fotorredução utilizando DCPIP	53
<b>5 Conclusões e Trabalhos Futuros</b>	<b>60</b>
<b>6 Referências Bibliográficas</b>	<b>63</b>
Carta da Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado e equipe	72
Trabalho da Profa. Adriane Petronilha Macedo ( <i>in memorian</i> )	73

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>TABELAS</b>		<b>página</b>
<b>Tabela 1</b>	<b>Preparo das misturas para a reação de fotorredução do DCPIP pela clorofila</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>Influência do extrato do caule sobre a germinação de sementes das culturas e das plantas daninhas</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>Influência do extrato das folhas sobre a germinação de sementes das culturas e das plantas daninhas</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>Efeito do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All. sobre o rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato de caule de aroeira</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 5</b>	<b>Supressão do rendimento quântico da fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 6</b>	<b>Efeito do extrato de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All. sobre o rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas de aroeira</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 7</b>	<b>Supressão do rendimento quântico da fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 8</b>	<b>Influência do extrato do caule sobre a fotorredução do DCPIP antes e depois de exposição à luz</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 9</b>	<b>Influência do extrato das folhas sobre a fotorredução do DCPIP antes e depois de exposição à luz</b>	<b>57</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURAS</b>		<b>página</b>
<b>Figura 1</b>	<b>Estrutura química de alguns herbicidas: atrazina, DCMU e paraquat</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Sítios de atuação do DCMU e do paraquat</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Diagrama de um cloroplasto</b>	<b>10</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Disposição do PSII, PSI, citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> e ATP-sintase na membrana tilacóide do cloroplasto</b>	<b>11</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Estruturas das clorofilas a e b</b>	<b>12</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Espectro de absorção das clorofilas a e b</b>	<b>13</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Complexo enzimático ATP-sintase</b>	<b>15</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Estrutura química da plastoquinona e do plastoquinol</b>	<b>17</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Esquema Z:</b>	<b>19</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Fluxo de elétrons na fotofosforilação cíclica</b>	<b>20</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Estrutura química de alguns aleloquímicos</b>	<b>23</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Formas oxidadas (azul) e reduzida (incolor) do DCPIP</b>	<b>28</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Árvore e folhagem de aroeira preta (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.)</b>	<b>32</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Medidas de fluorescência do extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr.All.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Medidas de fluorescência do extrato de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr.All.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Curva de absorvância do extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr.All.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Curva de absorvância do extrato de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr.All.</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS		página
Gráfico 1	Influência do extrato do caule sobre a germinação de soja, feijão e arroz	43
Gráfico 2	Influência do extrato do caule sobre a germinação de beldroega e braquiária	43
Gráfico 3	Influência do extrato das folhas sobre a germinação de soja, feijão e arroz	45
Gráfico 4	Influência do extrato das folhas sobre a germinação de beldroega e braquiária	45
Gráfico 5	Rendimento quântico da clorofila frente ao extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	48
Gráfico 6	Supressão de fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule	49
Gráfico 7	Rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	51
Gráfico 8	Supressão de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas	52
Gráfico 9	Fotorredução do DCPIP pela clorofila sob a influência do extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	55
Gráfico 10	Variação na absorvância da fotorredução do DCPIP, na ausência e presença de luz, na presença do extrato do caule de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	56
Gráfico 11	Fotorredução do DCPIP pela clorofila sob a influência do extrato das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	57
Gráfico 12	Variação na absorvância da fotorredução do DCPIP, na ausência e presença de luz, na presença do extrato das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	58
Gráfico 13	Porcentagem de fotorredução do DCPIP, na presença dos extratos do caule e de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr All.	59

## ABREVIATURAS

A	absorvância
ADP	adenosina - difostato
ATP	adenosina 5' trifosfato
Clor	clorofila
Cit <i>b<sub>f</sub></i>	complexo citocromo <i>b<sub>f</sub></i>
DCPIP	2,6 – diclorofenolindofenol
DCMU(diuron)	3-(3,4-declorofenil)-1,1-dimetiluréia
DPC	1,5-difenilcarbazida
EDTA	ácido etanodiaminotetraacético
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico])
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)etanosulfônico
NADP+	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
MV	metilviologen (ou paraquat) 1,1'-dimetil-4,4' bipiridilo íon ( dicloreto )
Q <sub>A</sub>	plastoquinona A
Q <sub>B</sub>	plastoquinona B
PS I	fotossistema I
PS II	fotossistema II
PS	fotossistema

# INTRODUÇÃO

## 1 – INTRODUÇÃO

O aumento da população, principalmente nos países do terceiro mundo, faz com que a cada ano que passa seja necessário produzir mais alimentos, com qualidade, e economicamente viáveis. Conseqüentemente, torna-se cada vez mais necessária a utilização de produtos químicos, fertilizantes e pesticidas (inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc.), que levem a um aumento da produtividade.

A luta do homem contra as plantas daninhas que infestam as lavouras é constante. Ao contrário das pragas e doenças, que aparecem eventualmente, as plantas daninhas aparecem o ano todo e seu controle se faz necessário sempre [1].

As perdas de produção agrícola por competição com infestantes no Brasil variam entre 25% e 90% [2]. Além de prejudicarem as culturas as plantas daninhas provocam também ações indiretas como, a hospedagem e transmissão de pragas e doenças e, muitas vezes, ocorrem ações alelopáticas, ocasionando perdas na produção [1,3].

Do ponto de vista botânico não existe planta má, ou daninha. Esta classe é caracterizada por plantas cujas particularidades morfológicas, anatômicas e fisiológicas as tornam inoportunas e concorrentes de outras plantas de exploração econômica [3].

Diversos procedimentos são usados no controle de plantas daninhas, entre estes está a utilização de herbicidas. Atualmente, existem numerosos herbicidas no mercado, mas estas substâncias químicas, de heterogeneidade muito grande, têm limitações quanto ao seu uso e podem deixar resíduos nos alimentos, ou causar danos ao meio ambiente, contaminando a água, ou ainda, deixando resíduos no solo [4]. Já se sabe também, que algumas plantas daninhas adquirem resistência a alguns herbicidas. Atualmente os herbicidas estão sendo também utilizados para dessecar algumas culturas de modo a facilitar a colheita [5].

Na busca por herbicidas mais eficientes, os pesquisadores estão tentando encontrar na natureza, a solução para estes problemas através de um fenômeno já conhecido desde a antiguidade que é a fabricação de metabólitos secundários (aleloquímicos) produzidos pelas próprias plantas e que interferem, prejudicando ou favorecendo o desenvolvimento de outras plantas próximas. Estes compostos podem atuar como herbicidas naturais. A este fenômeno foi dado o nome de alelopatia. Surge então, a possibilidade de se utilizar a

alelopatia, um fenômeno natural, para produzir herbicidas que sejam seletivos e não provoquem grandes danos ao meio ambiente e ao homem.

Esse tipo de estudo foi feito com sucesso para os inseticidas no caso dos piretróides, que são produzidos utilizando como modelo molecular as piretrinas, substâncias naturais obtidas do crisântemo [6,7,8].

Outros estudos estão sendo conduzidos com extratos de plantas com o objetivo de avaliar o seu potencial herbicida (alelopático). Frequentemente essa avaliação é feita através de testes sobre a germinação de sementes, e atualmente são feitos experimentos de avaliação da fotossíntese. Entre as técnicas utilizadas para avaliação da fotossíntese estão as medidas de avaliação da reação de Hill, através da fotorredução de aceptores de elétrons, medidas de evolução de oxigênio e medidas de fluorescência da clorofila [9]. Os herbicidas comerciais também atuam sobre a fotossíntese inibindo a reação de Hill provocando mudanças na fluorescência natural da clorofila.

Já são conhecidos alguns aleloquímicos que atuam em algumas etapas da fotossíntese. Um exemplo disso, foram os estudos feitos sobre as cumarinas. As medidas de fotorredução do oxidante de Hill 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) e de evolução de oxigênio mostraram que cumarinas isoladas de raízes de *Stauranthus perforatus* Lundell (Rutacea) provocam inibição da reação de Hill [10].

Outra planta que tem sido extensivamente estudada é o sorgo (*Sorghum bicolor* L.). Os primeiros estudos mostraram a atividade do extrato de sorgo sobre o desenvolvimento de algumas plantas. Uma metodologia foi desenvolvida para a extração do sorgoleone [11]. Utilizando esta metodologia, os pesquisadores testaram sorgoleone obtido de exudados hidrofóbicos das raízes de sorgo e verificaram que eles inibem fortemente o crescimento das raízes de alface (*Lactuca sativa* L.), mas não do milho (*Zea mays* L.), sugerindo que estas frações do exudados contêm certos inibidores biológicos, específicos da espécie [12]. Observou-se também, que o sorgoleone reduziu o crescimento de algumas plantas daninhas [13].

Estudos posteriores mostraram que exudados hidrofóbicos do sorgo contêm novas quinonas, provavelmente únicas no gênero, e materiais de atividade biológica seletiva [12]. Em concentrações de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de sorgoleone, a fotossíntese foi reduzida para menos que 50% do controle na taxa de evolução de oxigênio [14].



Verificou-se que sorgoleone e o herbicida comercial atrazina competem pelo local de ligação no PSII [15]. O sorgoleone é, portanto, potencialmente um herbicida muito efetivo [15]. Estudos estão sendo feitos produzindo compostos análogos ao sorgoleone para avaliar sua atividade herbicida [16]. Assim como têm sido desenvolvidos estudos dos extratos do sorgo é interessante que se busque em outras plantas aleloquímicos que apresentem potencial herbicida.

O Brasil possui uma das mais diversificadas floras do mundo e, portanto, há grandes possibilidades de que algumas dessas plantas possam produzir aleloquímicos potencialmente úteis, de modo que, depois de descoberta sua estrutura, se tenha condições de produzir análogos artificiais com as características desejadas.

Além disso, algumas plantas brasileiras de grande valor, estão correndo o risco de serem extintas; é importante, então, que se comece a estudá-las. Entre estas plantas está a *Myracrodruon urundeuva* Fr All (aroeira preta). Na literatura não há estudos sobre os efeitos de extratos desta planta na germinação de sementes de outras plantas e na fotossíntese.

Assim, este trabalho tem como objetivo dar início aos estudos do possível potencial herbicida desta planta. Este estudo será realizado avaliando os efeitos dos extratos metanólicos das folhas e do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira), sobre a germinação das sementes de *Glycine Max* L (soja), *Oriza sativa* L.(arroz), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Portulaca oleracea* L. (beldroega) e *Brachiária brizantha* (braquiária), e também sobre a fotossíntese da clorofila, extraída do *Spinacea oleraceae* (espinafre). Para os estudos sobre a fotossíntese será avaliada a Reação de Hill através de medidas da fotorredução do DCPIP e também serão avaliadas as medidas da fluorescência estacionária da clorofila.

**REVISÃO**  
**BIBLIOGRÁFICA**

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Herbicidas.

Herbicidas são substâncias ou misturas de substâncias destinadas a destruir ou impedir o desenvolvimento dos vegetais [3,17]. São compostos que, aplicados às plantas, reagem com seus constituintes morfológicos ou interferem nos seus constituintes bioquímicos, promovendo efeitos morfológicos ou fisiológicos de graus variáveis, podendo leva-las à destruição parcial ou total [17].

#### 2.1.1 -Tipos de herbicidas

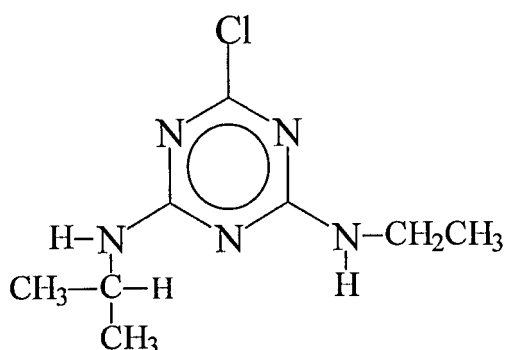
Os herbicidas classificam-se em inorgânicos e orgânicos. Os herbicidas inorgânicos foram largamente usados como herbicidas de contato, antes do advento dos herbicidas orgânicos que atualmente são mais utilizados na Agricultura e têm, em geral, fórmulas complexas. Eles podem ser classificados em três grandes classes:

Classe I – Herbicidas acíclicos, ex. brometo de metila;

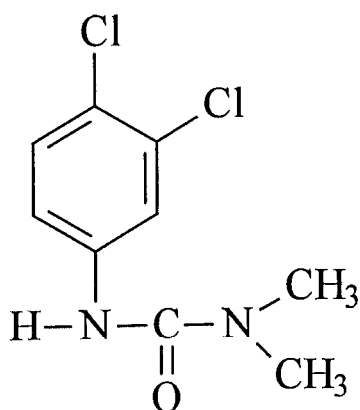
Classe II – Herbicidas homocíclicos, ex. pentaclorofenol;

Classe III – Herbicidas heterocíclicos, entre eles está o paraquat, conhecido também como metilviologen [17].

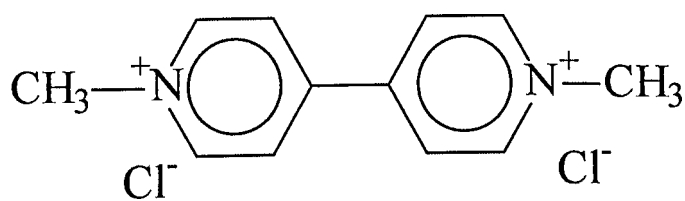
As estruturas de alguns herbicidas estão indicadas na Figura 1.



Atrazina



DCMU (ou diuron)



Paraquat ou metilviologen

**Figura 1: Estrutura química de alguns herbicidas: atrazina, DCMU e paraquat.**

### 2.1.2 - Ação dos herbicidas

A maioria dos herbicidas é dirigida contra o processo fotossintético [18]. Um exemplo desse tipo de herbicida é o DCMU ou diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) que desloca a quinona  $Q_B$  do seu sítio de ligação no fotossistema II e bloqueia a transferência de elétrons do fotossistema II ao fotossistema I (Figura 2) [19]. O sítio de ligação para a plastoquinona é o local de ação de muitos herbicidas que matam as plantas bloqueando a transferência de elétrons [21].

Outros herbicidas como, por exemplo, a atrazina, inibe a quebra da água para formar íon hidrogênio e oxigênio [4] e, outros ainda, interferem na transferência de elétrons dos dois fotossistemas [19,20,21].

Já o paraquat é um herbicida de contato, usado no controle não seletivo de plantas daninhas e na dessecação química da soja, do trigo, do linho e de outras culturas. Ele atua como acceptor de elétrons no fotossistema I (Figura 2) formando radicais tóxicos de  $O_2$ , que provocam a peroxidação de lipídeos e danos nas membranas, promovendo a dessecação das plantas em curto período de tempo [5]. O paraquat não atua sobre as sementes, nem é absorvido pelas raízes [22].

Esses dois herbicidas, DCMU e paraquat, são amplamente utilizados em experimentos, como falso positivo, envolvendo estudos da fotossíntese.

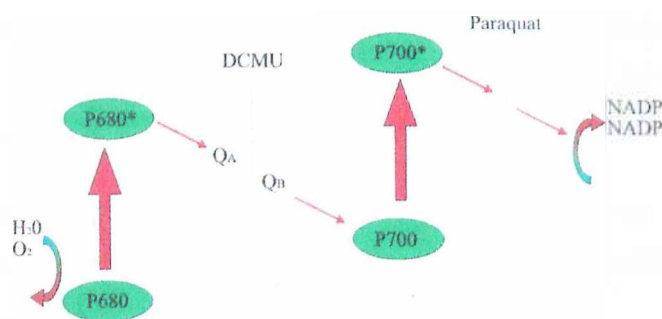


Figura 2: Sítios de atuação do DCMU e Paraquat [21].

## 2.2 - Fotossíntese

A vida sobre a terra depende principalmente da energia proveniente do Sol. A fotossíntese é o único processo de importância biológica que pode captar essa energia. Fotossíntese, literalmente, significa “síntese usando luz” [21].

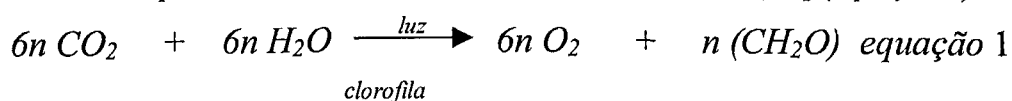
A totalidade do processo da fotossíntese tem lugar, desde o primeiro momento até o final, no cloroplasto, uma organela citoplasmática de arquitetura surpreendentemente complexa [23] (Figura 3).

A fotossíntese abrange dois processos: as **reações luminosas** e as **reações no escuro** e tem um mecanismo complexo que requer a interação de muitas proteínas e moléculas pequenas [19,21,24].

Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizadoras absorvem a energia luminosa e a conservam na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH; simultaneamente, o O<sub>2</sub> é produzido [19,21,24].

Nas reações de fixação do carbono, que ocorrem na ausência de luz, o ATP e o NADPH são usados para reduzir o CO<sub>2</sub> formando carboidratos. A formação de O<sub>2</sub> que ocorre apenas na luz, e a redução do CO<sub>2</sub>, que não requer luz, são, portanto, processos distintos e separados [19].

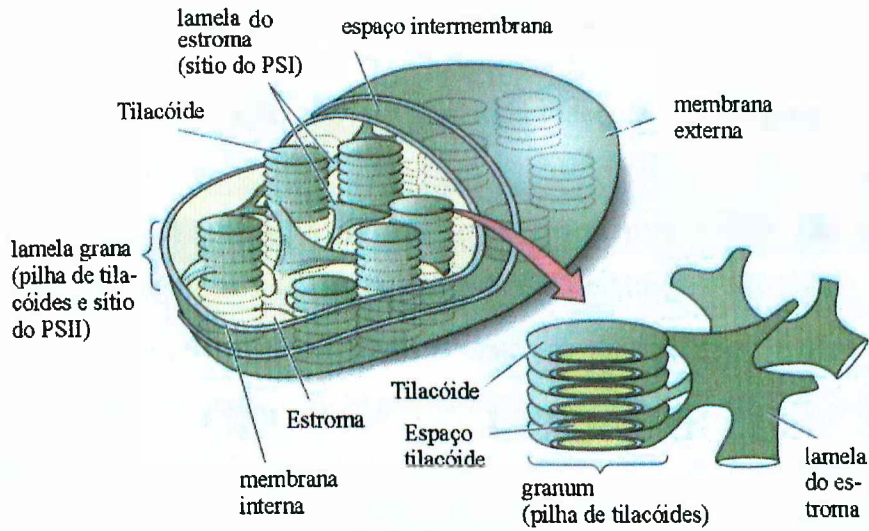
A equação total da fotossíntese descreve uma reação de oxidação-redução onde, a H<sub>2</sub>O doa elétrons para a redução do CO<sub>2</sub> até o carboidrato CH<sub>2</sub>O [19] (equação 1).



Para que essa reação ocorra, a energia luminosa é absorvida e utilizada para a transferência de elétrons através de uma série de compostos que atuam como doadores e receptores de elétrons [21].

### 2.2.1 – O cloroplasto e as tilacóides

Os cloroplastos são constituídos de uma membrana externa e outra interna, com um espaço intermembranoso (Figura 3).



**Figura 3 : Diagrama de um cloroplasto [21].**

Os cloroplastos, que tem em geral 5  $\mu\text{m}$  de comprimento, possuem uma membrana externa e outra interna, com um espaço intermembranoso (Figura 2). A membrana interna rodeia um estroma contendo enzimas solúveis e estruturas membranosas chamadas tilacóides, que são sacos achatados. Uma pilha desses sacos é chamada de um *granum* (plural, grana). Diferentes grana são conectadas por regiões de membranas tilacóide, chamadas de *lamelas do estroma*. As membranas tilacóides separam o espaço tilacóide do espaço do estroma. Desse modo, os cloroplastos têm três membranas diferentes (*externa, interna e tilacóide*) e três espaços separados (*intermembranoso, estroma e tilacóide*). Nos cloroplastos em desenvolvimento, os tilacóides surgem de invaginações da membrana interna [21,24].

As membranas tilacóides contêm o equipamento de transdução de energia: as proteínas captadoras de luz, os centros de reação, as cadeias de transporte de elétrons e a ATP sintase [21,24].

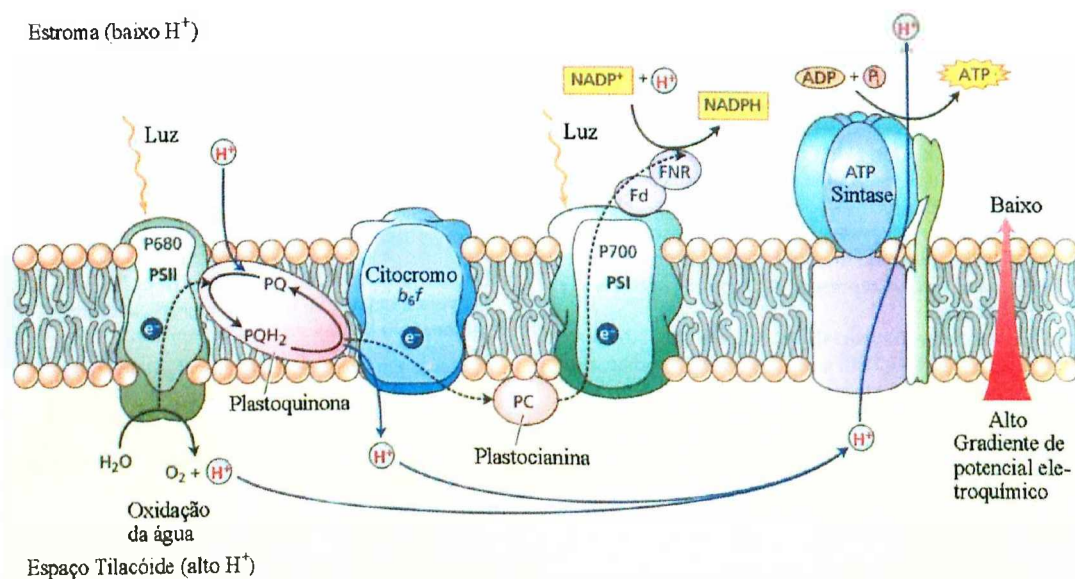
As reações na luz acontecem nas tilacóides. As reações de redução do carbono, ou reações de escuro, que são catalisadas por enzimas solúveis em água, acontecem no estroma, a região do cloroplasto externa as tilacóides [21,24].

A quase totalidade dos processos de reações à luz é feita por quatro grandes complexos de proteínas representadas na Figura 4 [21]:

- **Fotossistema II** : oxida a água a  $O_2$  no lúmen do tilacóide e nesse processo libera prótons dentro do lúmen.
- **Citocromo  $b_6f$** : recebe elétrons do PSII e os libera para o PSI. Ele também transporta prótons adicionais do estroma para dentro do lúmen.
- **Fotossistema I**: reduz  $NADP^+$  a  $NADPH$  no estroma pela ação da ferredoxina (Fd) e da flavoproteína ferredoxina-NADP redutase.
- **ATP-sintase**: produz ATP com prótons difundidos do lúmen para o estroma.

As proteínas da membrana tilacóide têm uma região apontada para o lado do estroma da tilacóide e a outra orientada para a porção interna da tilacóide (lúmen) [21,25].

Nos cloroplastos, a energia da luz é convertida em energia química por duas unidades funcionais diferentes chamadas de fotossistemas .



**Figura 4: Disposição do PSII, PSI, citocromo  $b_6f$  e ATP-sintase na membrana tilacóide do cloroplasto [21].**



### 2.2.2 – Os sistemas antena e os centros de reações

A primeira etapa da fotossíntese é a absorção de luz pela clorofila. A excitação elétrica resultante passa de uma molécula de clorofila para outra, em um complexo de captação de luz, até que a excitação seja captada por uma molécula de clorofila com propriedades especiais no centro de reação. Em tal centro de reação, a energia do elétron excitado é transformada em uma separação de cargas [21,24].

Além das clorofilas a e b (Figura 5), as membranas tilacóides contêm pigmentos acessórios, os carotenóides, que também absorvem luz e têm também, o papel de fotoproteção [19]. Cerca de 98% das clorofilas são utilizadas para a captação de luz do ambiente e são chamadas de pigmentos antena.

Os espectros de absorção das clorofilas a e b são diferentes entre si (Figura 6). A região do espectro de 500 a 600 nm é fracamente absorvida por estas clorofilas [24].

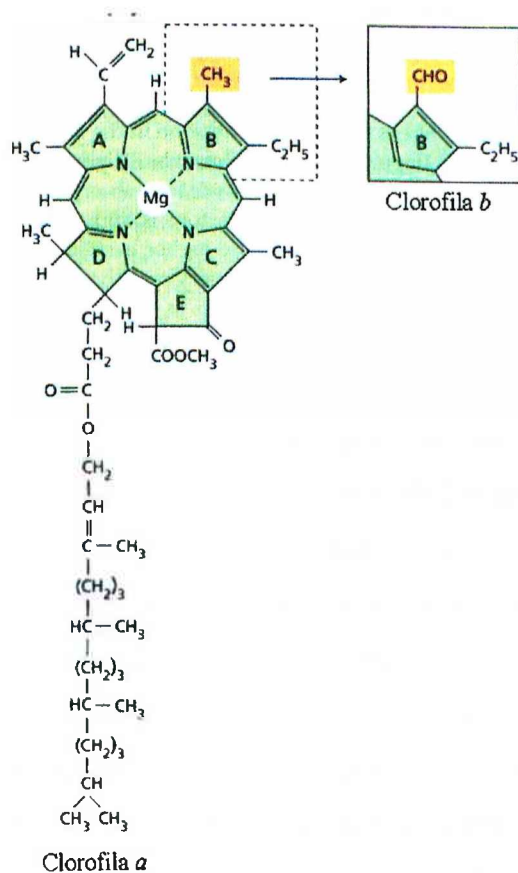


Figura 5 : Estruturas da clorofila a e b [21].

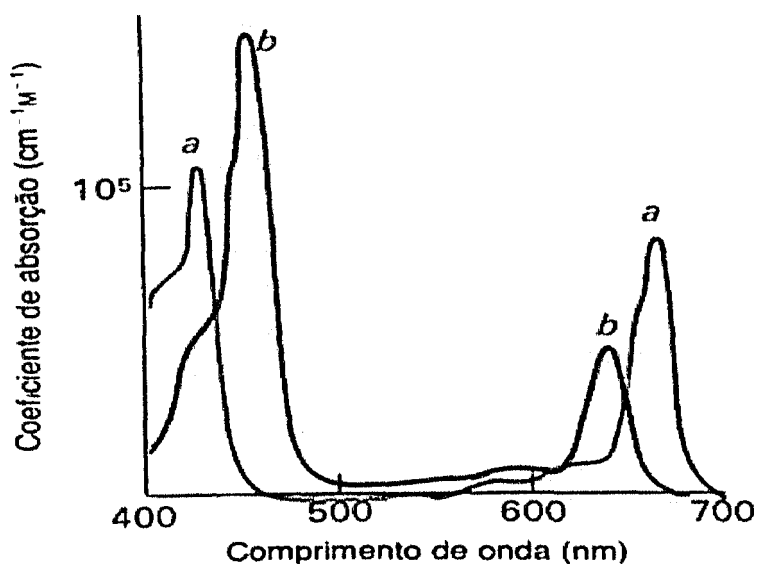


Figura 6 : Espectro de absorção das clorofilas a e b [24 ].

A transferência de energia no complexo antena é muito eficiente; aproximadamente 95 a 99% dos fótons absorvidos pelos pigmentos antena têm sua energia transferida para os centros de reação, onde ela pode ser usada fotoquimicamente [19,21].

Quando as moléculas de clorofila estão isoladas e são excitadas pela luz, a energia absorvida é rapidamente liberada como fluorescência e calor, mas quando, por exemplo, a clorofila está nas folhas das plantas e é excitada pela luz visível pouca fluorescência é observada porque esta energia é aproveitada no processo da fotossíntese. Ocorre, então, uma transferência direta da energia da clorofila excitada (uma clorofila antena) para uma molécula de clorofila vizinha, excitando esta segunda molécula e permitindo que a primeira retorne ao seu estado basal. Esta transferência ressonante de energia é repetida para uma terceira, quarta, ou subsequente vizinha, até que a clorofila do centro de reação fotoquímico torne-se excitada. Nesta molécula de clorofila especial, um elétron é promovido pela excitação a um orbital de energia superior. Este elétron então passa a um receptor de elétrons vizinho, que é parte da cadeia de transferência de elétrons do cloroplasto, deixando a molécula de clorofila excitada com um orbital vazio. O receptor de elétron, desta forma,

adquire uma carga negativa. O elétron perdido pela clorofila do centro de reação é substituído por um elétron de uma molécula vizinha doadora de elétrons, que se torna positivamente carregada. Desta forma, a excitação pela luz inicia uma cadeia de reações de oxidação-redução [19].

A transferência de energia por interações eletromagnéticas diretas entre moléculas de clorofila e daí para o centro de reação é muito rápida [19,24].

Quando a energia armazenada nas clorofilas no estado excitado é rapidamente dissipada por transferência de excitação ou por reações fotoquímicas, o estado excitado é dito suprimido (“quenched”)[19].

Se o estado excitado da clorofila não é rapidamente suprimido pela transferência de excitação ou por reações fotoquímicas, uma reação pode acontecer com o oxigênio molecular para formar um estado excitado do oxigênio conhecido como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2^*$ ). O oxigênio singlete, extremamente reativo, continua a reagir com muitos outros componentes celulares. Os carotenóides exercem sua ação fotoprotetora por suprimir (“quenching”) rapidamente o estado excitado da clorofila. O estado excitado do carotenóide não tem energia suficiente para formar oxigênio singlete; assim ele decai para seu estado fundamental, enquanto perde sua energia como calor [19].

### 2.2.3 – Os fotossistemas I e II e a ATP-sintase

Cada fotossistema tem seu próprio tipo de centro de reação fotoquímica e um conjunto de moléculas antenas. O fotossistema I possui um centro de reação designado de P700 e o fotossistema II apresenta um centro de reação designado por P680 [19,21,24].

O fotossistema II é constituído por um complexo de captação de luz (LHC-II “light-harvesting complex II”) formado por um núcleo com um centro de reação e um complexo de desprendimento de oxigênio [24].

O centro de reação do fotossistema II é formado por um par de subunidades semelhantes D1 e D2, de 32 kD, que atravessa a membrana tilacóide. Vários polipeptídios adicionais são necessários para a liberação de oxigênio [24]. D1 e D2 contêm o centro de reação e a cadeia transportadora de elétrons.

O fotossistema I contém um complexo de captação de luz (LHCI “light-harvesting complex I”). O centro de reação do fotossistema I é ligado a duas proteínas Psa e Psb [21,24].

Os fotossistemas I e II têm funções complementares. O fotossistema I, que pode ser excitado pela luz de comprimento de onda menor do que 700 nm, gera um redutor forte que leva à formação de NADPH. O fotossistema II, que requer luz de comprimento de onda menor do que 680 nm, produz um oxidante forte levando à formação de  $O_2$  [24].

Na fotofosforilação, os elétrons fluem através de uma série de transportadores ligados à membrana, incluindo os citocromos, quinonas e proteínas ferro-enzofre, enquanto os prótons são bombeados através de uma membrana para criar um potencial eletroquímico. Este potencial é a força impulsionadora para a síntese do ATP a partir do ADP e  $P_i$  pelo complexo da ATP-sintase [19].

A ATP-sintase (Figura 7), é um grande complexo enzimático constituída de duas partes: uma hidrofóbica ligada a membrana chamada  $F_0$  e uma que transpassa a membrana voltada para o estroma chamada  $F_1$ .  $F_0$  parece ser um canal através da membrana por onde os prótons podem passar e  $F_1$  é o local da síntese de ATP [21] (Figura 7).  $F_1$  é composto de, pelo menos 5 polipeptídeos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), formando uma estrutura esférica, que contém sítios catalíticos para a síntese de ATP.

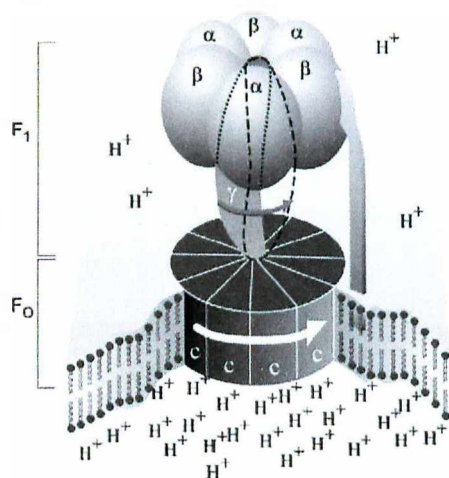
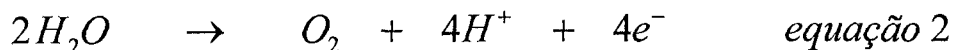


Figura 7: Complexo enzimático ATP-sintase [69].

#### 2.2.4 – Reação de evolução de oxigênio.

No PSII a oxidação de duas moléculas de água produz quatro elétrons, quatro prótons, e um O<sub>2</sub> (equação 2).



Os prótons produzidos pela oxidação da água são liberados dentro do lúmen do tilacóide.

O manganês (Mn) é essencial para o processo de oxidação da água [19,21,24]. Uma hipótese clássica postulada de experimentos em fotossíntese diz que os íons manganês sofrem uma série de oxidações, que são conhecidas como estados S, e são rotulados de S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub>, e são ligados à oxidação da água e geração de O<sub>2</sub>. Experimentos têm mostrado que íons Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> também são essenciais para evolução de O<sub>2</sub> [21,26,27,28].

Um carregador de elétrons (Z), atua entre o complexo de evolução de oxigênio e P680. Esta espécie foi identificada como sendo um radical formado por um resíduo de tirosina na proteína D1 do centro de reação do PSII [19,21,24].

#### 2.2.5 – Reações no PSI, no PSII e esquema Z

No PSII a energia de excitação dos elétrons converge das clorofilas antena para um par de clorofilas do centro de reação, chamado de P680. Dentro de picossegundos de excitação, um elétron é transferido do P680\* para a feofitina ligada (*Ff*). O centro de reação torna-se um radical catiônico, P680<sup>+</sup> [21,24].

P680 oxidado pela luz é reduzido pelo carregador de elétrons Z, que recebe elétrons da oxidação da água.

O elétron vai então da feofitina reduzida para uma plastoquinona permanentemente ligada no local Q<sub>A</sub> da subunidade D2. Uma quinona Q móvel liga-se a quinona Q<sub>B</sub> da subunidade D1. A plastoquinona Q<sub>A</sub> aceita um elétron da feofitina reduzida e o doa a plastoquinona Q para gerar Q<sup>-</sup>. Essa forma química parcialmente reduzida permanece ligada em Q<sub>B</sub> até que ela adquira um segundo elétron de Q<sub>A</sub>. QH<sub>2</sub> é então liberado de Q<sub>B</sub>.

A plastoquinona varia intercaladamente de uma forma oxidada (Q) para uma forma reduzida (QH<sub>2</sub>, plastoquinol) (Figura 8 e equação 3). O intermediário nessa redução de dois elétrons é um radical livre semiquinona.

QH<sub>2</sub> então se dissocia do complexo centro de reação e entra na porção hidrocarbonada da membrana, onde retorna seus elétrons para o citocromo complexo *b<sub>6</sub>f* [21,24].

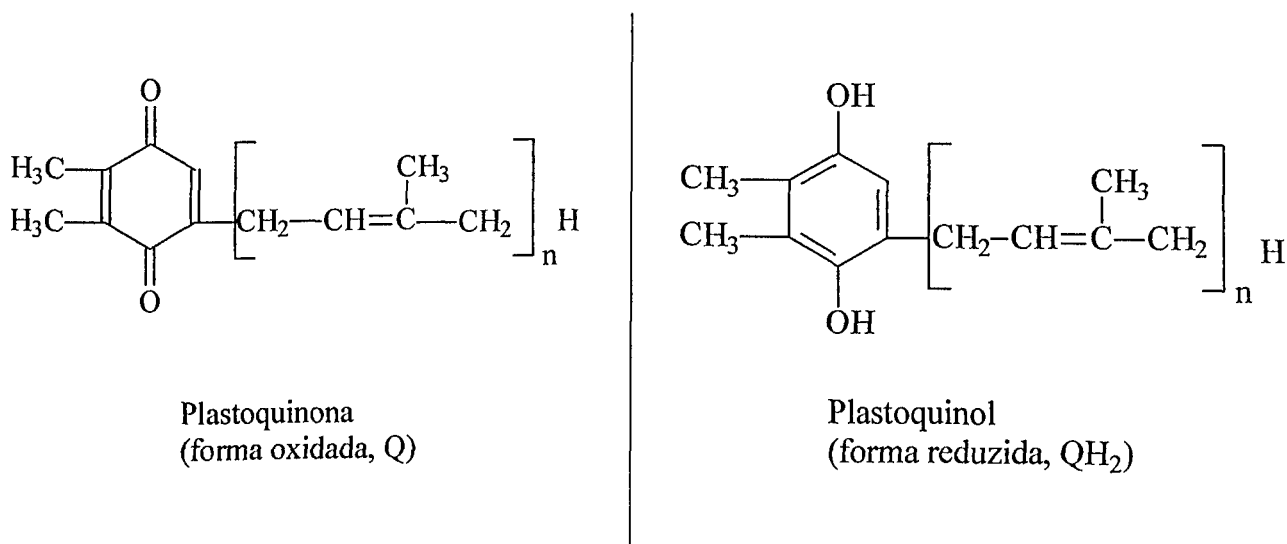
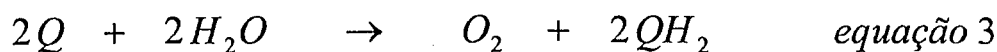
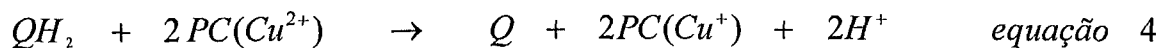


Figura 8: Estrutura química da plastoquinona e do plastoquinol.

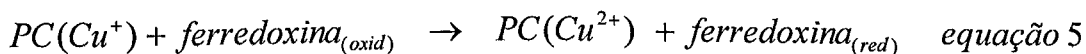
O complexo citocromo *b<sub>6</sub>f* transfere elétrons do plastoquinol (QH<sub>2</sub>) para a plastocianina (PC) (equação 4), uma proteína solúvel, que volta a reduzir P700<sup>+</sup> (P700 oxidado). O receptor de elétrons de P700 excitado (A<sub>0</sub>), que acredita-se ser uma clorofila, o próximo receptor (A<sub>1</sub>), uma quinona (vitamina K<sub>1</sub>), e uma série de proteínas ferro-enzofre ligadas à membrana (FeS<sub>x</sub>, FeS<sub>A</sub> e FeS<sub>B</sub>) transferem elétrons para ferredoxina solúvel. A flavoproteína solúvel ferredoxin-NADP redutase (FNR ou Fp) reduz NADP<sup>+</sup> para NADPH [19,21,24].

Um gradiente de prótons é formado quando os elétrons fluem do fotossistema II para o I através do complexo do citocromo *b<sub>6</sub>f*.



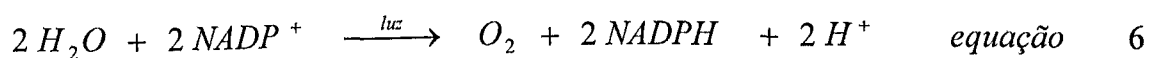
O fotossistema I gera NADPH por formar ferredoxina reduzida, um redutor poderoso. A luz converge das clorofilas antena para o P700, um par de moléculas de clorofila *a*. O evento primário no centro de reação é uma separação de cargas induzidas pela luz. Um elétron é transferido do P700\*, o estado excitado da clorofila do centro de reação, para uma clorofila receptora chamada *A<sub>0</sub>* para formar *A<sub>0</sub><sup>-</sup>* e P700<sup>+</sup>. Enquanto isso, o P700<sup>+</sup> captura um elétron da plastocianina para voltar a P700, para que seja de novo excitado.

O elétron de potencial muito alto de *A<sub>0</sub><sup>-</sup>* é transferido para *A<sub>1</sub>*, uma quinona (vitamina K<sub>1</sub>), e daí para FeSx, um aglomerado ferro-enxofre. Esses três aceptores de elétrons também se localizam no núcleo do dímero PsaA-PsaB do fotossistema I. O elétron ativado salta, então, para um aglomerado ferro-enxofre. A etapa final é a redução da ferredoxina (*Fd*), uma proteína hidrossolúvel, contendo pelo menos um aglomerado ferro-enxofre. Essa reação ocorre no lado estromático da membrana tilacóide. Assim, a reação global catalisada pelo fotossistema I é (equação 5):



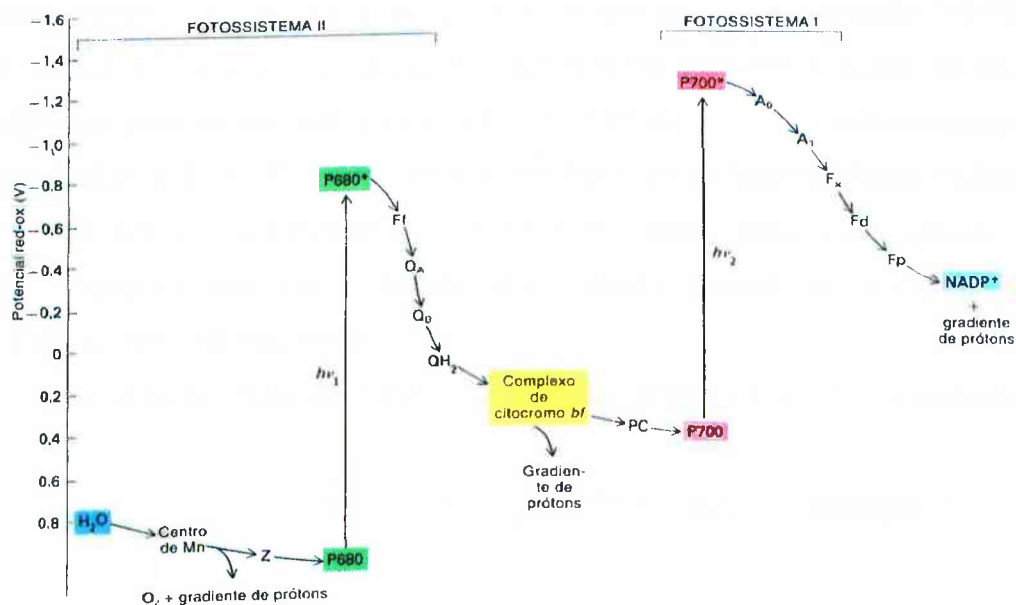
Os elétrons de alto potencial de duas moléculas de ferredoxina são então transferidos para o NADP<sup>+</sup> para formar NADPH [18].

A reação global executada pelo fotossistema II, pelo complexo de citocromo *b<sub>6</sub>f* e pelo fotossistema I é (equação 6):



O esquema Z representa a ligação entre os fotossistemas I e II e as reações acima citadas, envolvidas no processo da fotossíntese. Neste esquema Z, as substâncias

envolvidas estão colocadas no seu ponto médio de potencial redox (Figura 9). As linhas verticais representam absorção de fóton pelo centro de reação: P680 para PSII e P700 para PSI.



**Figura 9: Esquema Z [24]:** Ff, feofitina;  $Q_A$ , plastoquinona;  $Q_B$ , uma segunda plastoquinona;  $QH_2$ , plastoquinona reduzida; PC, plastocianina;  $A_0$ , clorofila aceptora de elétrons;  $A_1$ , aceptor de elétrons;  $F_x$  ( $FeS_x$ ), um centro ferro-enxofre; Fd, ferredoxina; Fp, flovoproteína (ferredoxina –  $NADP^+$  redutase); Z, um radical tirosila [24].



### 2.2.6 – Fotofosforilação não-cíclica e fotofosforilação cíclica

Assim como o fluxo de elétrons dentro de cada fotossistema, o fluxo de elétrons do fotossistema II para o I gera um gradiente de prótons transmembrana que impulsiona a formação de ATP. Este processo é chamado fotofosforilação não cíclica [19,24].

Existe também o fluxo cíclico de elétrons que envolvem somente o PSI (fotofosforilação cíclica) (Figura 9). Neste caso, os elétrons transportados para a ferredoxina não continuam para o  $\text{NADP}^+$ , mas voltam por meio do complexo do citocromo *b<sub>6</sub>f* para a plastocianina. A plastocianina doa os elétrons para a forma oxidada do P700. Este fluxo cíclico de elétrons é acoplado ao bombeamento de prótons dentro do lúmen do tilacóide que pode ser utilizado para a síntese de ATP, mas não para oxidar a água ou para reduzir  $\text{NADP}^+$  [16,18]. O fotossistema II não participa na fotofosforilação cíclica e por isso não se forma  $\text{O}_2$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}$ . A fotofosforilação cíclica ocorre quando não há  $\text{NADP}^+$  disponível para aceitar elétrons da ferredoxina reduzida, devido a uma relação muito alta de NADPH para  $\text{NADP}^+$  [24].

A equação da reação geral para o fluxo cíclico de elétrons e a fotofosforilação é:

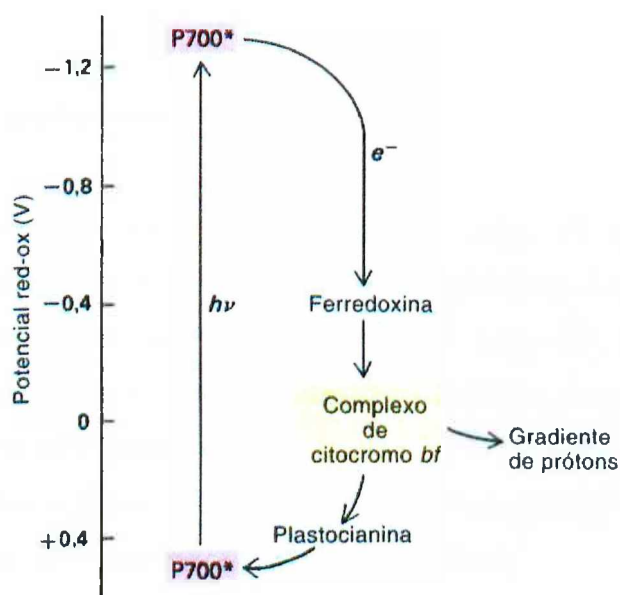


Figura 10 : Fluxo de elétrons na fotofosforilação cíclica [24].

### 2.3 – Alelopatia

O termo alelopatia foi criado por Molisch (1937) a partir das palavras gregas alleton (mútuo) e pathos (prejuízo). Apesar da precisão da etimologia, tem sido interpretado de diversas maneiras. Para Molisch, que primeiro o usou, o termo alelopatia engloba todas as interferências desencadeadas entre plantas, incluindo microorganismos, provocadas pela liberação de substâncias químicas por eles elaboradas, através dos tecidos vivos ou mortos. Abrange, portanto, efeitos benéficos e prejudiciais provocados por um organismo (doador) sobre outro (receptor). Muitos autores, porém, restringem o significado da palavra somente para efeitos prejudiciais e apenas entre plantas superiores, excluindo, portanto os microorganismos [6].

Outros autores, tendo em consideração que estas mesmas substâncias químicas influenciam as relações entre outros organismos que não só plantas, tais como destas com insetos e herbívoros, propuseram que o termo abrangesse todas as interferências entre seres vivos provocadas por substâncias químicas por eles elaboradas, quer ocorressem ou não, no reino vegetal. Segundo Almeida, este conceito, pela sua generalização, parece ser o mais adequado [6].

As substâncias alelopáticas são também denominadas de aleloquímicos ou produtos secundários [6].

#### 2.3.1 - Natureza e produção dos aleloquímicos

Não se conhece com exatidão como os aleloquímicos são formados nas células. Alguns autores são de opinião de que se trata de simples resíduos do metabolismo celular que seriam armazenados nos vacúolos, onde se encontram em maior quantidade, a fim de evitar sua própria autotoxicidade, ou simplesmente substâncias de reserva de que a célula se serviria quando delas tivesse necessidade [6].

A natureza química desses produtos é muito diversa e alguns só atuam quando em presença de outros, em combinações e proporções específicas.

Entre alguns tipos de aleloquímicos conhecidos estão as quinonas, os flavonóides e outros. As quinonas, como a juglona das folhas, frutos e cascas da noqueira, impedem que debaixo da copa e na área até onde se desenvolvem as raízes cresçam outras espécies. Os flavonóides, como a florizina encontrada nas raízes da macieira, são inibidores do crescimento das plântulas da própria espécie e alguns dos seus derivados são tóxicos para outras. Alguns taninos hidrolisáveis são conhecidos como inibidores da germinação de sementes [6].

A Figura 11 apresenta as estruturas de alguns destes aleloquímicos.



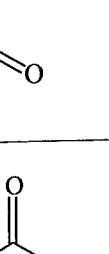

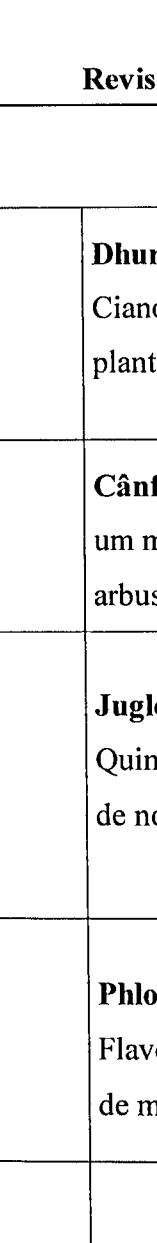
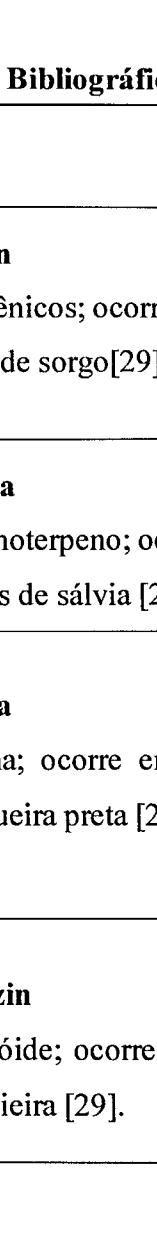
	<p><b>Dhurrin</b> Cianogênicos; ocorre em plantas de sorgo[29].</p>
	<p><b>Cânfora</b> um monoterpeno; ocorre em arbustos de sálvia [29].</p>
	<p><b>Juglona</b> Quinona; ocorre em árvores de noqueira preta [29].</p>
	<p><b>Phlorizin</b> Flavonóide; ocorre em raízes de macieira [29].</p>
	<p><b>Sorgoleone</b> exudado das raízes do sorgo [13].</p>
	

Figura 11: Estrutura química de alguns aleloquímicos.

### 2.3.2 – Funções dos aleloquímicos nos organismos, liberação no meio ambiente e mecanismo de ação

Os aleloquímicos interferem na conservação, dormência e germinação das sementes, crescimento das plântulas e vigor vegetativo das adultas, por atuarem nas funções vitais da respiração, fotossíntese, divisão celular, nutrição e reprodução [6].

As substâncias alelopáticas das plantas podem ser liberadas de suas folhas como compostos voláteis ou lixiviados, ou também podem ser exudados através das raízes ou de seus tecidos mortos ou, também, podem ser lixiviados das folhas mortas na superfície do solo [29]. As plantas têm capacidade de produzir aleloquímicos em todos os seus órgãos, se bem que, num mesmo indivíduo, a natureza química não seja forçosamente igual em todos eles [29].

A forma como as substâncias alelopáticas atuam nas plantas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores, mas o processo ainda se encontra pouco esclarecido. As funções que afetam o mecanismo de atuação são muito similares as dos herbicidas. Tal como nestes, a dificuldade de se entender o processo está em que, na maior parte dos casos, os alelopáticos afetam mais de uma função, e provocam efeitos secundários difíceis de se distinguir dos principais [6].

Os aleloquímicos podem atuar em muitos sítios dentro das células das plantas, como por exemplo, prejudicando a germinação das sementes, inibindo a fotossíntese nos cloroplastos, inibindo ou estimulando a respiração na mitocôndria, etc [29].

Pesquisa feita com dehydrozaduzanin C (DHZ), isolado de diferentes membros da família Compositae, teve sua atividade fitotóxica estudada sobre a germinação de alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) e cenoura (*Daucus carota* L.), e encontrou-se que o efeito do DHZ é maior que o efeito de um herbicida comercial (LOGRAN) na mesma concentração [30].

Estudos feitos com extrato de folhas de angico-vermelho mostraram interferências no índice mitótico da alface (*Lactuca sativa* L.) e provocaram aumento da percentagem de anomalias no ciclo celular da canafistula (*Peltophorum dubium* Taub.).

Na literatura tem sido publicado que algumas substâncias alelopáticas afetam o transporte de elétrons e a fosforilação nos cloroplastos de maneira muito semelhante à forma como atuam os herbicidas inibidores da fotossíntese [32].

Verificou-se também que os exudados de sorgo interferiram no desenvolvimento do feijoeiro provocando modificações na divisão celular [33]. Experimentos conduzidos sobre os efeitos do sorgoleone em cloroplastos isolados mostraram que estes alelquímicos atuam diretamente no mecanismo fotossintético. Exudados hidrofóbicos das raízes de sorgo provocaram interrupção da função mitocondrial em mitocôndrias extraídas da soja [34]. Estudos mais detalhados mostraram que o sorgoleone (extraído do sorgo) é um inibidor da transferência de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$  no lado redutor do PSII, por deslocar  $Q_B$  da proteína D1. O PSI não é afetado por concentrações de sorgoleone dez vezes maiores do que a requerida para a inibição completa da atividade de Hill [15].

## **2.4 – Metodologias comumente utilizadas na literatura para avaliação do potencial alelopático de extratos de plantas**

### **2.4.1 - Preparação do extrato**

O método mais usado para se obterem lixiviados da parte aérea das plantas ou de resíduos mortos é o de aspergi-los com água. O soluto recolhido é usado em bioensaios de germinação de sementes de espécies indicadoras, normalmente em placas de Petri. Em outra alternativa, em vez de lixiviados, utiliza-se com freqüência nestes mesmos testes, extratos de órgãos ou de toda a planta, vivos ou mortos. São macerados em água ou em solventes orgânicos ou inorgânicos, a frio ou a quente, por diferentes períodos de tempo. O soluto é depois filtrado e/ou centrifugado [6].

#### 2.4.2- Germinação

Os testes de germinação constituem a metodologia mais comumente encontrada na literatura para avaliação de efeitos alelopáticos [24].

Do ponto de vista fisiológico, a germinação consiste no processo que se inicia com o suprimento de água à semente seca e termina quando o crescimento da plântula se inicia. Este momento, ou seja, quando há saída da radícula através do tegumento, é o mais comumente considerado [35].

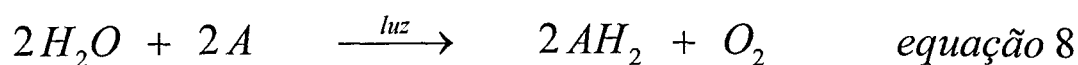
#### 2.4.3- Avaliação da fotossíntese

Várias técnicas já foram desenvolvidas para avaliação da interferência de aleloquímicos no processo fotossintético. Entre estas técnicas estão a avaliação da atividade de Hill, medidas de evolução de oxigênio e medidas de fluorescência.

Para as avaliações *in vitro*, os cloroplastos são isolados em meios e temperaturas adequados. É necessário utilizar algumas substâncias artificiais que atuam em certos sítios do processo fotossintético como aceptores ou doadores de elétrons; o uso de alguns herbicidas, cujos sítios de ação são conhecidos, como falso positivo é comum. A utilização dessas substâncias permite avaliar separadamente algumas etapas da fotossíntese. Entre as substâncias utilizadas estão os aceptores de elétrons DCPIP (aceita elétrons do PSII) e o paraquat (aceita elétrons do PSI), os bloqueadores de elétrons do PSII para o PSI como o DCMU e os doadores de elétrons para o PSII, o DPC [9].

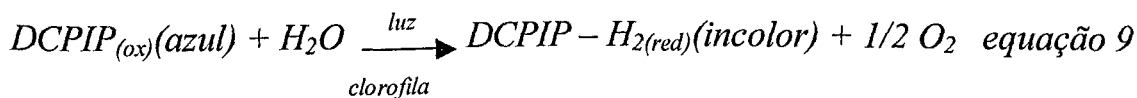
#### Reação de Hill

Em 1937, Hill verificou que cloroplastos isolados em suspensão, quando expostos à luz na presença simultânea de receptores de elétrons, produzem  $O_2$  e reduzem os aceptores de elétrons não biológicos adicionados. Hill utilizou oxalato férrico e outros compostos contendo  $Fe^{+3}$  como aceptores de elétrons e mediu a taxa de reação por meio da produção de  $O_2$ . Essa reação é conhecida como reação de Hill (equação 8) [19].



onde: A é o receptor de hidrogênio artificial [19].

Outro aceptor de elétrons muito utilizado é o DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) [9,19]. Sabe-se que ele aceita elétrons no PSII, de modo que um meio de se determinar a atividade fotossintética no PSII são as medidas de fotorredução desta substância. A taxa de redução deste composto pode ser medida por espectrofotometria, medindo-se a taxa de desaparecimento da coloração azul da forma oxidada do DCPIP (equação 9 e Figura 12) [35,36,37,38,39].

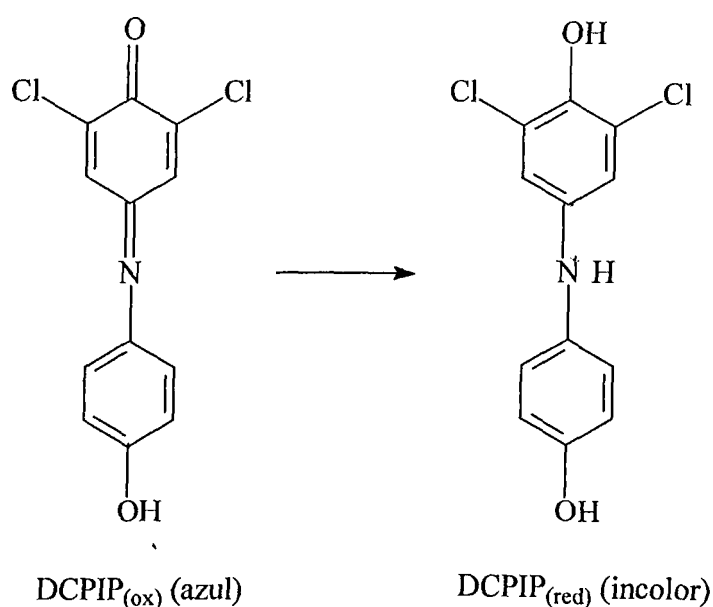


Uma demonstração da atividade do transporte de elétrons de cloroplastos isolados pode ser feita iluminando-se uma suspensão de cloroplastos por um período de tempo (10 min) e medir a mudança na absorbância causada pela redução do aceptor de elétrons. Um aceptor de elétrons largamente utilizado é o DCPIP [9].

Nestes experimentos é necessário quantificar a clorofila. Equações para estimar as clorofilas *a* e *b* em 80% de acetona têm sido obtidas pelo coeficiente de extinção específico dos pigmentos puros e observada a absorção [40]. Para medidas de clorofila em acetona 80% as equações 13 ou 14 podem ser utilizadas [40,41].

Para um composto ser analisado por espectrofotometria, ele deve absorver luz, e essa absorção deve ser distinguível daquela oriunda de outras substâncias presentes na amostra [40]. Em nosso experimento o aceptor de elétrons escolhido foi o DCPIP porque os extratos do caule e de folhas têm absorvância extremamente pequena em 600nm, pico máximo de absorção do DCPIP [9].



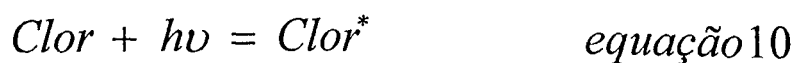


**Figura 12: Formas oxidada (azul) e reduzida (incolor) do DCPIP [19].**

#### 2.4.4- Fluorescência da clorofila

A medida da fluorescência da clorofila é estabelecida como uma importante técnica em estudos fisiológicos de ecologia de plantas [42,43,44].

A emissão de fluorescência dos cloroplastos é controlada pelo estado de oxidação do centro fotoquímico do PSII [45]. A inibição do transporte de elétrons no processo fotossintético resulta na modificação da cinética de indução de fluorescência da clorofila, devido ao aumento da dissipação de energia radiante via fluorescência da clorofila [46,47]. Quando a clorofila (Clor), absorve luz, ela fica no estado excitado (equação 10):



No estado excitado superior, a clorofila é extremamente instável e perde parte da sua energia às circunvizinhanças na forma de calor muito rapidamente; ela entra no estado menos excitado, onde pode ficar estável por vários nanosegundos ( $10^{-9}$ s). Por causa desta

inerente instabilidade do estado excitado, alguns processos de captura de energia podem ser extremamente rápidos.

Nesse estado, a clorofila excitada tem vários caminhos possíveis para utilizar sua energia disponível, como por exemplo:

- 1- Ela pode reemitir um fóton e, deste modo, retornar ao seu estado fundamental – processo conhecido como fluorescência. Quando ela faz assim, o comprimento de onda de fluorescência é ligeiramente maior (e de energia mais baixa) que o comprimento de onda de absorção, porque uma porção de energia de excitação é convertida em calor antes do fóton fluorescente ser emitido. A clorofila fluoresce na região do vermelho do espectro.
- 2- A clorofila excitada pode retornar ao seu estado fundamental por conversão direta em calor de sua energia de excitação, sem a emissão de um fóton.
- 3- Num terceiro passo, o fotoquímico, a clorofila excitada é desativada e transfere sua energia para as moléculas vizinhas; a energia do estado excitado pode então ser utilizada para realizar as reações químicas [21]

Quando a energia armazenada nas clorofilas no estado excitado é rapidamente dissipada por transferência de excitação ou fotoquimicamente, o estado excitado é dito suprimido (“quenched”) [19].

Supressão é o processo pelo qual a emissão de uma molécula excitada é diminuída pela transferência de energia para uma outra molécula (o supressor). O supressor excitado pode perder sua energia devido a uma variedade de processos [48].

A medida de fluorescência (emissão de luz pela molécula excitada) da clorofila pode ser feita e assim pode servir para avaliar o processo fotossintético [9]. Essa avaliação pode ser feita calculando-se o rendimento quântico do processo.

O quanta absorvido por pigmentos associados ao PSII pode ser usado para o trabalho fotoquímico, pode ser transferido para o PSI, ou pode ser dissipado como calor ou fluorescência [49].

Em geral, a fluorescência da clorofila no estado estacionário e a taxa fotossintética são inversamente relacionadas, de tal forma que se a fluorescência da clorofila é baixa a taxa de fotossíntese é alta. No entanto, a fluorescência da clorofila pode também diminuir

quando a fotossíntese é baixa, por causa da intensificação da ação do “quenching” protetivo atuando na fluorescência da clorofila [50].

O rendimento quântico ( $\Phi$ ) de um processo no qual as moléculas doam sua energia de excitação (ou “degeneram”) é a fração de moléculas excitadas que degeneram por essa via metabólica. Matematicamente, o rendimento quântico de um processo, tal como o fotoquímico, é definido pela equação 11 [21].

$$\Phi_{\text{fotoq}} = \frac{\text{produção de produtos fotoquímicos}}{\text{número total de quanta absorvido}} \quad \text{equação 11}$$

O valor de  $\Phi$  para um processo particular pode variar de 0 ( se esse processo nunca está envolvido no declínio do estado excitado ) a 1,0 (se esse processo sempre serve para desativar o estado excitado). A soma dos rendimentos quânticos de todos os processos possíveis é 1,0 [21].

Em cloroplastos funcionais mantidos em luz fraca, o rendimento quântico do processo fotoquímico é aproximadamente 0,95 e o rendimento quântico da fluorescência é 0,05 ou menor. Os rendimentos quânticos de outros processos são negligenciáveis [21].

Um dos métodos que pode ser utilizado para medidas experimentais de  $\Phi_f$  é o método do Padrão Secundário que consiste no uso de espécies cujo  $\Phi_f$  é conhecido e é o método mais utilizado devido à sua simplicidade [51]. A relação matemática que permite obter o valor experimental do  $\Phi_f$  é dada pela equação 12.

$$\Phi_f = \left( \frac{A_p F n^2}{A F_p n_p^2} \right) \Phi_p \quad \text{equação 12}$$

onde:  $A_p$  = a absorção do padrão nos respectivos comprimentos de onda de excitação;

$A$  = a absorção da amostra nos respectivos comprimentos de onda de excitação;

$F$  = a área sob a curva de emissão da amostra;

$F_p$  = a área sob a curva de emissão do padrão;

$n$  = o índice de refração do solvente onde se encontra a amostra;

$n_p$  = o índice de refração do solvente onde se encontra o padrão;

$\Phi_p$  = rendimento quântico de fluorescência do padrão;

$\Phi_f$  = rendimento quântico de fluorescência da amostra em estudo [51].

## 2.5 - A planta *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira preta)

A aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (Figura 13), sinonímia botânica - *Astronium juglandifolium* Griseb., *Astronium urundeuva* (Fr. All.), é uma planta que pertence à Família Anacardiaceae [48,49]. Ela é conhecida popularmente como aroeira, urundeuva, aroeira-do-sertão (CE), aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeuva, arindeuva, aroeira-preta [52,53]. Um de seus nomes comuns – urundeuva – vem de um conceito guarani para “incorrutível na água” [54].

O nome aroeira é citado como sendo uma “currutela” de araras e da terminação eira, significando “árvore da arara”, por ser essa a planta onde a ave preferencialmente pousa e vive [55].

Ocorre desde o Ceará (caatinga) até o estado do Paraná e Mato Grosso do Sul [52,53]. Sua ocorrência é mais freqüente no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás [53].

A família Anacardiaceae contém cerca de 600 espécies de árvores arbustos incluindo algumas árvores ornamentais populares [56,57]. No Brasil conhecem-se aproximadamente 40 espécies [56].

A maior parte dos membros dessa família tem tecidos resinosos. Alguns dos exudados resinosos são tóxicos, causando severas irritações da pele [57].

Quanto às características morfológicas, sua altura é de 6 a 14 m no cerrado e caatinga e de até 20 a 25 m em solos mais férteis da floresta; com tronco medindo de 50 a 80 cm de diâmetro [52].

A madeira é excelente para obras externas como postes, moirões, esteios, estacas, dormentes, vigas, armações de pontes e moendas de engenho; na construção civil é usada como caibros, vigas, tacos para assoalhos, ripas para peças torneadas, etc. [52,53]. A árvore, pela beleza de sua copa aproximadamente piramidal e por outras qualidades ornamentais, é indicada para a arborização em geral. Seu único inconveniente é a perda das folhas durante o inverno e as reações alérgicas que provoca à certas pessoas sensíveis que entrem em contato com ela [52].

Quanto às informações ecológicas, é uma planta decídua, característica de terrenos secos e rochosos; ocorre em agrupamentos densos, tanto em formações abertas e muito secas (caatinga) até em formações muito úmidas e fechadas [52].

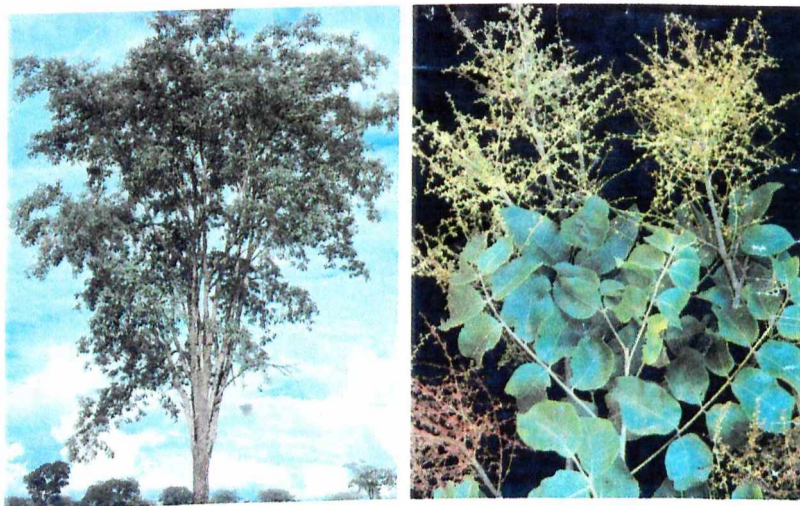
Floresce durante os meses de junho-julho, geralmente com a planta totalmente despida de sua folhagem. A maturação completa dos frutos inicia-se no final do mês de setembro, prolongando-se até outubro [52].

A casca, rica em tanino tem utilização na indústria do curtume [53]. O cerne desta árvore, reputado como podendo durar mais de um século, servia outrora aos aborígenes para fabricarem suas lanças; no norte de Minas Gerais é a preferida para cercar terrenos [53].

Possui também algumas propriedades medicinais, sendo o chá da casca usado contra gastrite, diarreia, inflamação na garganta e úlcera, e o pó é usado como cicatrizante por apresentar cerca de 15% de tanino [53,58]. A tintura de aroeira, contendo  $15 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ácido tânico, é constituinte do medicamento Anapyon<sup>®</sup>.

Estudos sobre a sua madeira revelaram a presença de proantocianinas e sugerem que a presença destas e/ou a associação de lignina e taninos podem explicar a grande resistência da madeira com relação a degradação química e biológica [59]. A aroeira, pela excelente qualidade de sua madeira, tem sido explorada intensamente e de forma irracional, sem que haja replantio e, nem mesmo, manejo para sua regeneração natural, visando uma produção auto-sustentada [55]. “O fim, em dez anos”. É esse o tempo para que acabem as aroeiras, calculam

técnicos  
[54].



**Figura 13: Árvore e folhagem de aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) [52].**

**PROCEDIMENTOS**

**EXPERIMENTAIS**

### 3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 - Preparação do extrato de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.

As folhas e o caule de aroeira foram coletados da árvore, na Fazenda São José, município de Uberaba, região do triângulo Mineiro. Os extratos foram feitos segundo uma modificação de Amadioha [60] e Coutinho e colaboradores [61]. Depois de secos ao ar livre, as folhas ( $50,671 \pm 0,001\text{g}$ ) e o caule ( $52,083 \pm 0,001\text{g}$ ) foram triturados separadamente e colocados em metanol por 32 dias (folhas) e 2 meses (caule) em frasco escuro; a seguir, o metanol foi evaporado à aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$  em aparelho rotaevaporador (QUIMIS – MOD. 3442). Obteve-se ao final  $5,217 \pm 0,001\text{ g}$  do extrato do caule e  $3,081 \pm 0,001\text{ g}$  do extrato das folhas.

Os extratos foram guardados em frasco escuro na geladeira até o momento de uso. Para cada experimento foi necessário dissolver 10 mg das amostras dos extratos com 5 a 7 gotas de etanol. A seguir, a solubilização era efetuada com a adição de água deionizada no aparelho Milli Q, até a concentração final de  $100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Foram medidos os valores de pH de cada solução e feitas as curvas de absorção da solução estoque de cada extrato (concentração =  $100,0\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), na região UV/Vis no espectrofotômetro Spectronic GENESYS 5.0. Também foram medidas as absorvâncias a 600 nm e determinados os picos de absorvância.

#### 3.2 - Teste de germinação

A influência do extrato sobre a germinação foi analisada através do cálculo da porcentagem de sementes germinadas. As germinações foram feitas numa germinadora para sementes, com alternância de temperatura CT-718, marca Cientec (Incubadora tipo B.O.D., com fotoperíodo e alternância de temperatura). As sementes de *Oriza sativa* L. (arroz), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Glycine max* L. (milho), *Portulaca oleracea* L. (beldroega), e *Brachiária brizantha* (braquiária) foram lavadas e colocadas por 2 minutos em solução de NaClO (1:10); em seguida, foram lavadas com água deionizada. A seguir,

foram tratadas com o extrato de folhas 15 sementes de *Oriza sativa* L. (arroz), 15 de *Phaseolus vulgaris* L (feijão), 25 de *Glycine max* L. (soja), 25 sementes de *Portulaca oleracea* L. (beldroega) e 15 de *Brachiária brizantha* (braquiária). Com o extrato do caule foram tratadas 10 sementes de *Oriza sativa* L. (arroz), 10 de *Phaseolus vulgaris* L (feijão), 10 de *Glycine max* L. (soja), 10 sementes de *Portulaca oleracea* L. (beldroega) e 15 de *Brachiária Brizantha* (braquiária). Estas sementes foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, previamente esterilizadas, contendo papel filtro e 10 mL de água deionizada, às quais foram adicionadas as soluções teste de extrato: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O experimento foi feito em triplicata, num total de 15 placas para cada planta. As placas foram colocadas na germinadora por 5 a 7 dias, a 25°C no escuro. Para a semente de braquiária, a germinação foi observada após quinze dias devido a sua dormência. Para os testes com as sementes de braquiária foi necessário romper a dormência das mesmas deixando as sementes em água quente (aproximadamente 85°C) por 15 minutos [62]. Depois elas foram deixadas na germinadora por 15 dias, uma vez que é recomendada que a germinação da braquiária seja observada à partir do sétimo dia [63]. As sementes foram consideradas germinadas quando o tamanho da radícula tinha pelo menos 0,2 mm [64].

### 3.3 – Medidas de fluorescência estacionária

As medidas de fluorescência da clorofila foram feitas em um fluorímetro de marca Fluorescence Spectrophotometer F-4500 da HITACHI, com fendas F1 e F2 iguais a 5 nanômetros, acoplado a um computador onde as leituras foram registradas.

#### 3.3.1 - Preparação de membranas tilacóides fotossintéticas

Os cloroplastos foram extraídos como descrito por Rimando [65]. As folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) utilizando um liquidificador, foram trituradas e homogeneizadas, em 200 mL de solução extratora, tamponada em pH 7,8, gelada, contendo sorbitol a 330  $\text{mmol.L}^{-1}$ , tricina – NaOH a 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  a 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , ascorbato de sódio a 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , EDTA à 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  e albumina bovina sérica a 0,05%. A mistura foi filtrada através de quatro camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado numa centrífuga



Allegra 21R, com refrigeração, da marca Beckman, a 1100 x g por 5 min a 4 °C. O “pellet” contendo os cloroplastos foi ressuspense em 25 mL de tampão lisante gelado, contendo tricina – NaOH a 25 mmol.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> a 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e centrifugado a 3000 x g por 5 minutos. O “pellet” contendo as membranas tilacóides foi ressuspense em 5 mL de meio tamponado e gelado formado por sorbitol a 100 mmol.L<sup>-1</sup>, tricine – NaOH a 25 mmol.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> a 10 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl a 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,8.

### 3.3.2 – Quantificação da clorofila

A quantificação da clorofila foi feita de acordo com Strain [40]. Um volume de 50µL de clorofila extraída conforme o item 3.3.1 foi coletada e colocada em um balão volumétrico de 5 mL. O volume de aferição foi completado com solução de acetona 80% v/v. A seguir, fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV/vis (Spectronic GENESYS 5), a 665 nm e 649 nm. A equação para quantificação da clorofila de acordo com Strain [40] está representada na equação 13.

$$A_{665} \times 665 + A_{649} \times 17,72 = \mu\text{g}_{\text{Clorofila}} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{equação 13}$$

### 3.3.3 – Medidas de fluorescência da clorofila

As medidas de fluorescência da clorofila foram feitas de acordo com modificações do método proposto por Rimando [65]. As membranas tilacóides (200 µg.mL<sup>-1</sup> de clorofila) foram adicionadas em meio tamponado, gelado, composto de 0,4 mol.L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mmol.L<sup>-1</sup> de MOPS e 13 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl em tubos com rolhas. Alíquotas para atingir a concentração final desejada do extrato, tanto do caule quanto da folha, foram misturadas dentro do meio e incubadas no escuro por pelo menos 30 minutos, numa temperatura entre 3 e 5 °C.

As concentrações de extrato e de metilviologen utilizadas foram de 5 µg.mL<sup>-1</sup>; 10 µg.mL<sup>-1</sup>; 15 µg.mL<sup>-1</sup>; e 20 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo que o comprimento de onda de excitação

utilizado foi de 660 nm e a medida de emissão de fluorescência foi registrada entre 640-800nm.

Os dados sobre as medidas de fluorescência estacionária da clorofila, frente aos extratos, foram transferidos para o programa ORIGIN 5.0, onde as áreas, sob as curvas, foram determinadas para cada concentração dos extratos e em cada intensidade de luz. Com estes resultados, calculou-se o rendimento quântico de acordo com a equação 12, e em seguida calculou-se a supressão de fluorescência ( $\Phi_0 / \Phi_{[ext]}$ ). O padrão escolhido foi o violeta de cresila, que tem um rendimento quântico  $\Phi_p$  de 0,54, índice de refração  $n_p$  de 1,3615, absorvância do padrão  $A_p$  de 0,0531 e área da curva de fluorescência  $F_p$  de 3618,2 (950 V).

### 3.4 – Medidas de fotorredução utilizando DCPIP

Os extratos da planta, tanto da folha quanto do caule, foram preparados como descrito no item 3.1, de modo a se obter uma concentração da solução estoque de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As alíquotas, usadas nos testes, tiveram a concentração final de 0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As medidas foram feitas em triplicatas.

Para este teste, o isolamento dos cloroplastos, e quantificação da clorofila tiveram outros procedimentos, descritos a seguir.

#### 3.4.1 – Preparo das suspensões de cloroplastos

As folhas de *Spinaca oleracea* (espinafre) foram lavadas em água destilada e secadas com papel absorvente; os pecíolos e nervuras centrais foram removidos [66]. Aproximadamente 20 g de folhas foram pesadas e cortadas em fragmentos pequenos, com cerca de 1  $\text{cm}^2$ . A seguir, o material foi macerado em gral de porcelana ( $a \pm 2^\circ\text{C}$ ), com 20 mL de solução de sacarose 0,5  $\text{mol.L}^{-1}$ , a  $2^\circ\text{C}$ , por 4 min. Adicionou-se mais 20 mL da sacarose 0,5  $\text{mol.L}^{-1}$  e macerou-se por 30 segundos. Filtrou-se o homogeneizado em quatro camadas de gaze. os resíduos foram pressionados contra a gaze, para aumentar o rendimento da filtração. Dividiu-se o filtrado em duas partes iguais e centrifugou-se a  $0^\circ\text{C}$  e 200 x g por 15 min. O sedimento resultante continha células intactas e resíduos de parede

celular, ficando os cloroplastos no sobrenadante. Os sobrenadantes foram transferidos para dois tubos gelados, tomando cuidado para não ressuspender os sedimentos, que não são estáveis. Os dois tubos foram centrifugados a 0°C e 1000 x g por 7 min. O sedimento resultante continha os cloroplastos. Os sobrenadantes foram descartados e cada sedimento foi ressuspensão em 12 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em pH 6,5. Então, as duas porções de suspensão de cloroplastos foram combinadas. Em todo o processo, procurou-se manter os cloroplastos sob temperatura próxima a 0°C para que fosse mantida a sua atividade. Portanto, todos os recipientes, instrumentos e soluções estavam gelados no momento de seu uso [66].

#### 3.4.2 - Diluição das suspensões de cloroplastos

Para se assegurar que a reação de Hill se processaria em uma taxa mensurável, a quantidade de clorofila na mistura para a reação foi ajustada a um valor conhecido. A quantificação de clorofila total foi feita de acordo com Arnon [41] (equação 14).

$$C = \frac{A_{652} \times 1000}{34,5} \times \text{fator de diluição} \quad \text{equação 14}$$

Misturou-se 1,0 mL da suspensão-estoque de cloroplastos com 20 mL de acetona 80% (v/v) e mediu-se a absorvância em 652 nm (usando branco de acetona 80%). A seguir quantificou-se a clorofila.

Diluiu-se a suspensão-estoque de cloroplastos em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> para se obter uma concentração final de clorofila de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> [66].

#### 3.4.3 - Preparo das misturas para a reação com DCPIP

As misturas para a reação de fotoredução do DCPIP pela clorofila foram preparadas conforme indicado na Tabela 4, sendo que os cloroplastos só foram adicionados no início de cada teste.

#### 3.4.4 - Medida da Atividade da Reação de Hill

Os tubos com as misturas, indicadas na Tabela 1 (sem a adição dos cloroplastos), foram colocados em béqueres com água e gelo de modo a se manter a temperatura sempre próxima de 0 °C. Fez-se o ensaio sob o mínimo de luz indireta.

As suspensões de cloroplastos foram adicionadas nos três primeiros tubos (todos os testes foram feitos em triplicata), os quais foram vedados com parafilme e misturou-se por inversão de 5 vezes. A absorvância em 600 nm foi medida antes da incidência de luz. A seguir ligou-se o projetor de slides GAF 2669, que foi utilizado como fonte de luz para a reação.

Os tubos ficaram expostos por 10 minutos à fonte de luz do projetor de slides e, em seguida, mediu-se novamente a absorvância em 600 nm [66].

O mesmo procedimento foi feito para os tubos restantes, fazendo sempre as medidas de absorvância em 3 tubos de cada vez, antes e depois de 10 minutos de exposição à luz do projetor de slides.

**Tabela 1: Preparo das Misturas para a reação de fotorredução do DCPIP pela clorofila**

Amostra	Concentração do extrato/ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Tampão/ (mL)	H <sub>2</sub> O/ ( $\mu\text{L}$ )	DCPIP/ mL Conc. final $0,2\text{mmol.L}^{-1}$	Volume do extrato/ ( $\mu\text{L}$ )	Suspensão de cloroplastos/ mL
Extrato do caule	0	1	2000	1	0	1
	0,5	1	1750	1	250	1
	1,0	1	1500	1	500	1
	1,5	1	1250	1	750	1
	2,0	1	1000	1	1000	1
Extrato de folhas	0	1	2000	1	0	1
	0,5	1	1750	1	250	1
	1,0	1	1500	1	500	1
	1,5	1	1250	1	750	1
	2,0	1	1000	1	1000	1

**RESULTADOS E  
DISCUSSÕES**

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 – Pré-emergência (germinação)

#### 4.1.1 – Influência do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. sobre culturas e plantas daninhas

Os resultados obtidos nos testes do extrato do caule sobre a pré-emergência (germinação) encontram-se na Tabela 4 e Gráficos 1 e 2.

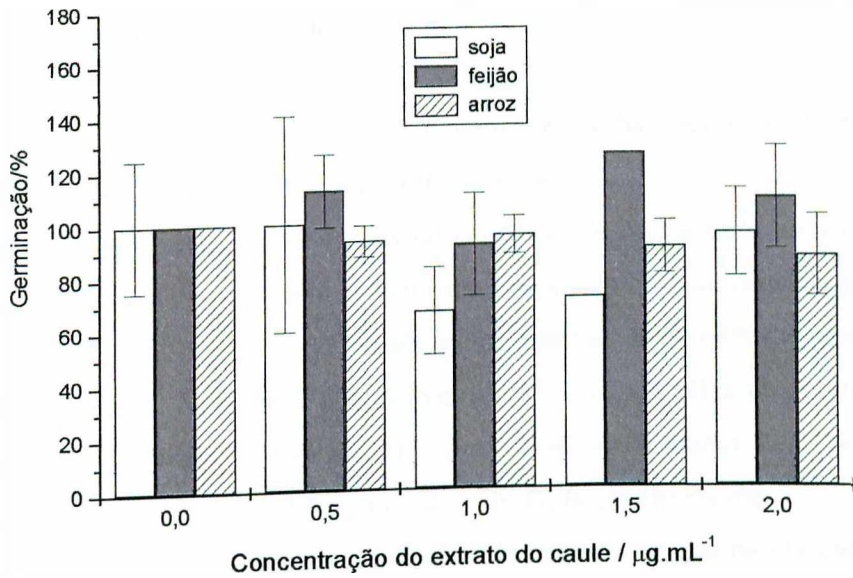
A análise dos dados relacionados ao extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. para as culturas, mostrou que a soja teve diminuição da germinação de 33% e de 29% nas concentrações de 1,0 e 1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente; o feijão teve um aumento de 25% da germinação na presença de 1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato. Não houve nenhuma diferença significativa na germinação do arroz como mostra a Tabela 2 e Gráfico 1. Já para as plantas daninhas, não houve diferença significativa na germinação da beldroega; a braquiária sofreu uma diminuição de 36% na germinação na presença de 1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e um aumento de 50%, quando na presença de 2,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato, como mostra a Tabela 2 e Gráfico 2.

**Tabela 2: Influência do extrato do caule sobre a germinação de sementes das culturas\* e das plantas daninhas\*.**

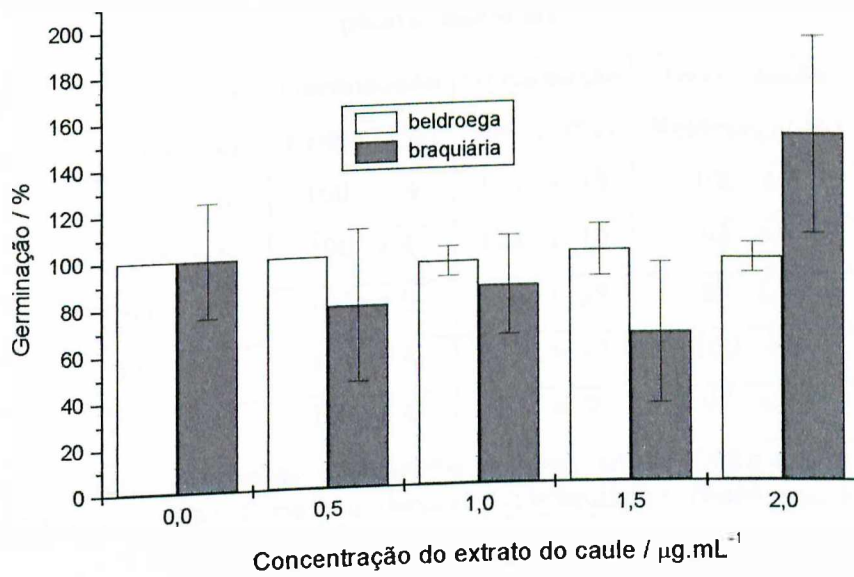
Concentração do extrato/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Germinação Soja / (%)	Germinação Feijão / (%)	Germinação Arroz / (%)	Germinação Beldroega / (%)	Germinação Braquiária / (%)
0	100 ± 25	100 ± 0	100 ± 12	100 ± 0	100 ± 25
0,5	100 ± 40	113 ± 13	93 ± 6	100 ± 0	79 ± 33
1,0	67 ± 17	92 ± 19	95 ± 7	96 ± 6	86 ± 21
1,5	71 ± 0	125 ± 0	90 ± 10	100 ± 11	64 ± 30
2,0	95 ± 17	108 ± 19	87 ± 15	96 ± 6	150 ± 43

\* culturas: soja = *Glycine max*; feijão = *Phaseolus vulgares*; arroz = *Oriza sativa*.

Plantas daninhas: beldroega = *Portulaca oleracea* L.; braquiária = *Brachiaria brizantha*



**Gráfico 1: Influência do extrato do caule sobre a germinação de soja, feijão e arroz.**



**Gráfico 2: Influência do extrato do caule sobre a germinação de beldroega e braquiária.**



#### 4.1.2 – Influência do extrato da folha de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. sobre culturas e plantas daninhas.

Os resultados obtidos nos testes do extrato das folhas sobre a pré-emergência (germinação) encontram-se na Tabela 3 e Gráficos 3 e 4.

A análise dos dados relacionados ao extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. para as culturas (Tabela 6 e Gráfico 3) mostra que a soja teve aumento na germinação de 23% na presença de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato e uma diminuição de 68% da germinação na presença de  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato; não houve diferença significativa na germinação das sementes de feijão (Tabela 3 e Gráfico 3); o arroz teve um aumento de 24% e 32% da germinação na presença de  $0,5$  e  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato, respectivamente.

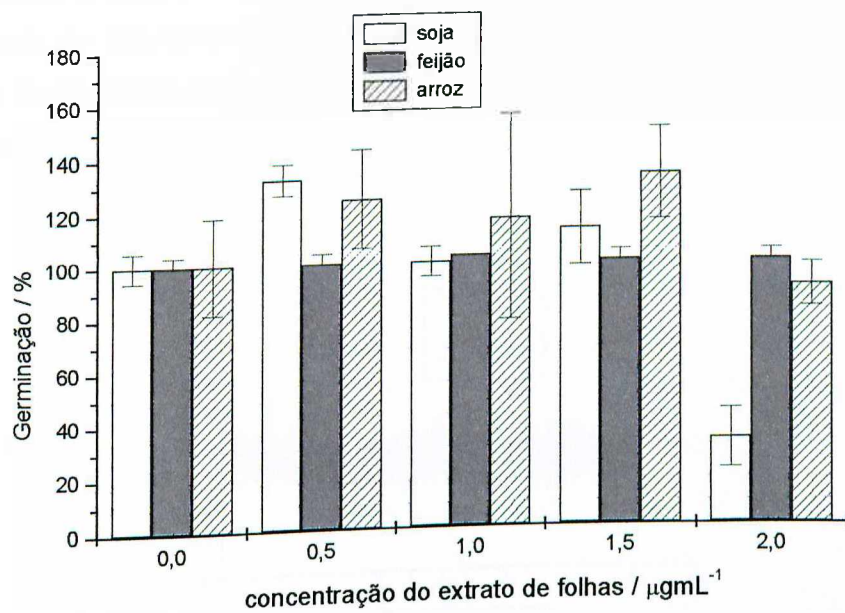
Para as plantas daninhas (Tabela 3 e Gráfico 4), observa-se que não houve diferença significativa na germinação da beldroega. A braquiária teve diminuição de 50%, 25%, e 29% da germinação na presença de  $1,0$ ;  $1,5$  e  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato, respectivamente.

**Tabela 3: Influência do extrato das folhas sobre a germinação de sementes das culturas\* e das plantas daninhas\*.**

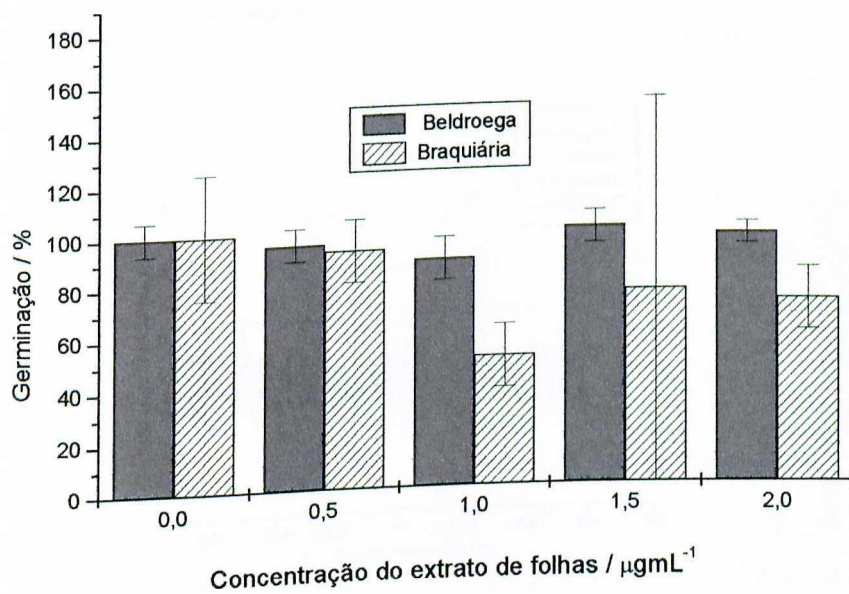
Concentração do extrato / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Germinação Soja / (%)	Germinação Feijão / (%)	Germinação Arroz / (%)	Germinação Beldroega / (%)	Germinação Braquiária / (%)
0	100 ± 6	100 ± 4	100 ± 18	100 ± 6	100 ± 25
0,5	123 ± 6	100 ± 4	124 ± 18	96 ± 6	93 ± 13
1,0	94 ± 6	102 ± 0	116 ± 39	89 ± 9	50 ± 25
1,5	112 ± 14	100 ± 4	132 ± 17	100 ± 7	75 ± 75
2,0	32 ± 11	100 ± 4	90 ± 9	97 ± 4	71 ± 17

\* culturas: soja = *Glycyne max*; feijão = *Phaseolus vulgares*; arroz = *Oriza sativa*.

Plantas daninhas beldroega = *Portulaca oleracea* L.; braquiária = *Brachiaria brizantha*



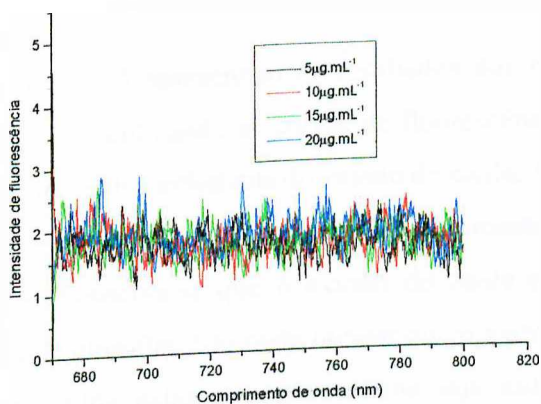
**Gráfico 3: Influência do extrato de folhas sobre a germinação de soja, feijão e arroz.**



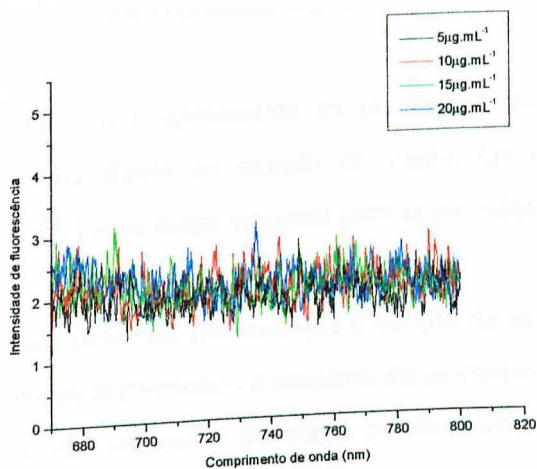
**Gráfico 4: Influência do extrato de folhas sobre a germinação de beldroega e braquiária.**

#### 4.2 - Medidas de fluorescência estacionária

Os testes de fluorescência dos extratos do caule e de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. mostrados nas Figuras 14 e 15, indicam que eles não têm fluorescência significativa.



**Figura 14: Medidas de fluorescência do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**



**Figura 15: Medidas de fluorescência do extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**

Os resultados das medidas de fluorescência estacionária da clorofila, frente aos extratos de folhas e caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr All., foram transferidas para o programa ORIGIN 5.0, onde foram determinadas as áreas sob as curvas para cada concentração dos extratos e em cada intensidade de luz. Com estes resultados calculou-se o rendimento quântico de acordo com a equação 12 e em seguida calculou-se a supressão de fluorescência ( $\Phi_0 / \Phi_{[ext]}$ ).

A Tabela 4 e o Gráfico 5 apresentam os resultados dos rendimentos quânticos obtidos através da equação 12, utilizando as curvas de fluorescência em 950 V e 950 V após iluminação de 2 minutos, sob a influência do extrato do caule. A fluorescência em 950 V foi considerada fluorescência máxima e 950 V com luz, fluorescência máxima saturante.

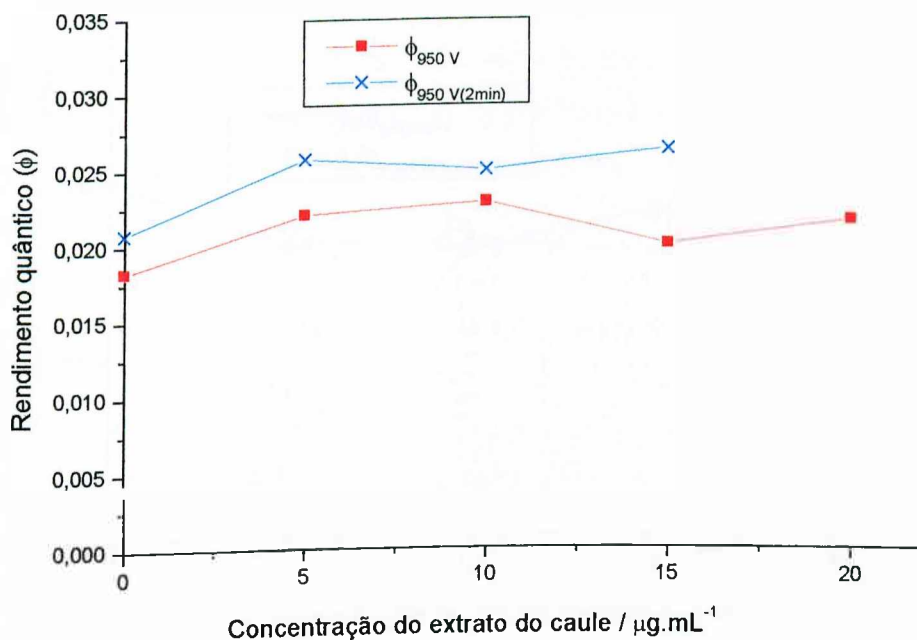
Por estes resultados, observa-se que o extrato do caule estimula o rendimento quântico de fluorescência da clorofila. Isto pode indicar que o extrato do caule pode estar impedindo que a luz absorvida pelas clorofilas antena seja utilizada para o trabalho fotossintético de forma eficiente. O excesso de energia está sendo emitido na forma de aumento de fluorescência [50], aumentando o rendimento quântico de fluorescência da amostra em estudo. Considerando que o princípio ativo que está no extrato pode estar em quantidades ínfimas, sugere-se repetir estes resultados com uma maior concentração do extrato ou com frações do extrato contendo o princípio ativo. Sugere-se ainda, o isolamento do princípio ativo.

A Tabela 5 e Gráfico 6 apresentam os resultados obtidos para a supressão de fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule. Os cálculos de supressão de fluorescência ( $\Phi_0 / \Phi_{[ext]}$ ) foram feitos somente para as medidas obtidas em 950 V e 950 V com luz saturante.

Os resultados, mais uma vez, indicam que o extrato do caule atua de modo a inibir a supressão da fluorescência, favorecendo o aumento do rendimento quântico da amostra. Ele deve estar atuando, como supressor de carga no fotossistema I e/ou fotossistema II, favorecendo o aumento do rendimento quântico de fluorescência, diminuindo a supressão da fluorescência.

**Tabela 4: Efeito do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sobre o rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule de aroeira.**

Concentração do extrato / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\Phi_{950\text{ v}}$ (%)	$\Phi_{950\text{ v}}$ (%) Luz (2min)
0	$1,8 \times 10^{-2}$ (100)	$2,1 \times 10^{-2}$ (100)
5	$2,2 \times 10^{-2}$ (122)	$2,6 \times 10^{-2}$ (123,8)
10	$2,3 \times 10^{-2}$ (127,8)	$2,5 \times 10^{-2}$ (119)
15	$2,0 \times 10^{-2}$ (111,1)	$2,6 \times 10^{-2}$ (123,8)
20	$2,2 \times 10^{-2}$ (122)	Não realizado



**Gráfico 5: Rendimento quântico da clorofila frente ao extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.**

Tabela 5: Supressão do rendimento quântico da fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule.

Concentração do extrato / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\Phi_0 / \Phi_{[\text{ext}]}$ (950 V)	$\Phi_0 / \Phi_{[\text{ext}]}$ (950 V) Luz (2min)
0	1	1
5	0,8	0,8
10	0,8	0,8
15	0,9	0,8
20	0,8	Não realizado

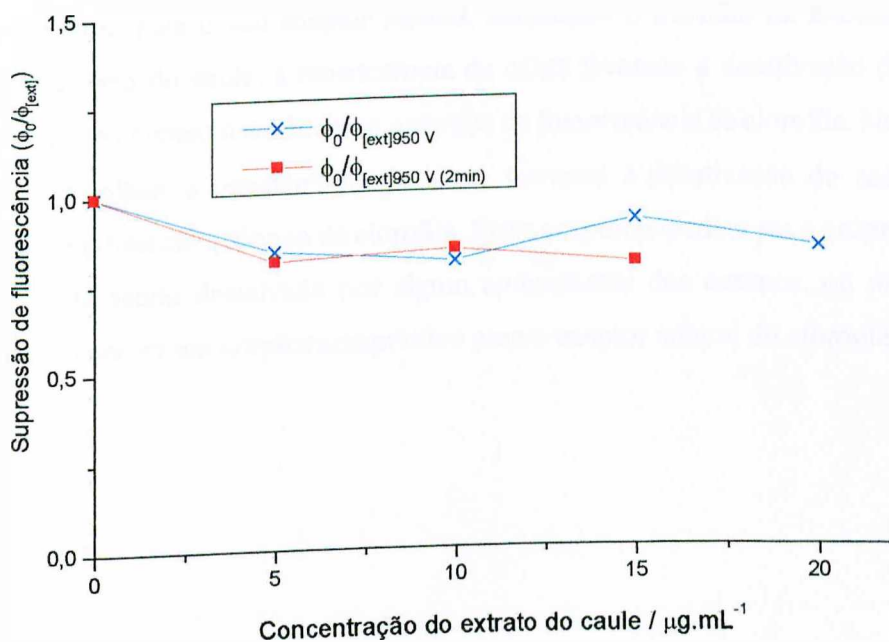


Gráfico 6: Supressão de fluorescência da clorofila frente ao extrato do caule.

A Tabela 6 e o Gráfico 7 apresentam os resultados obtidos com o extrato das folhas sobre o rendimento quântico da fluorescência da clorofila. Os resultados indicam, de um modo geral, uma diminuição do rendimento quântico da fluorescência da amostra, à medida em que se aumenta a concentração do extrato das folhas. Esta diminuição pode refletir a contribuição da produção de calor como um mecanismo de dissipar energia, ou seja, o extrato da folha pode estar contribuindo para a dissipação da fluorescência na forma de calor ou outro tipo de energia [50].

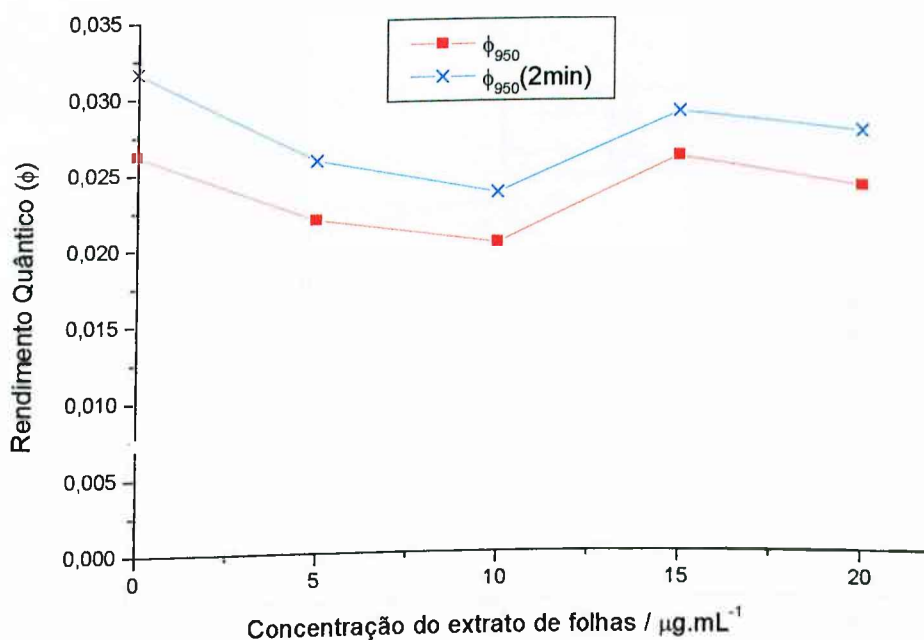
A Tabela 7 e o Gráfico 8 apresentam os dados de supressão do rendimento quântico da clorofila sob o efeito do extrato das folhas.

Analisando os resultados, observa-se que o extrato de folhas mostra uma tendência em suprimir o rendimento quântico da fluorescência da clorofila. Isto pode indicar um prejuízo no trabalho fotossintético, uma vez que parte da energia está sendo dissipada [50].

Os extratos da folha e do caule podem estar inibindo a fotossíntese por caminhos diferentes (Esquema 1) [67]. A clorofila excitada, na ausência de ambos os extratos, transfere o elétron para o seu acceptor natural, realizando o trabalho da fotossíntese. Na presença do extrato do caule, a transferência de carga favorece a desativação do acceptor pela emissão, aumentando o rendimento quântico de fluorescência da clorofila. Na presença do extrato das folhas, a transferência de carga favorece a desativação do acceptor pela supressão do rendimento quântico da clorofila. Estes aceptores podem ser o próprio acceptor natural que está sendo desativado por algum componente dos extratos, ou os próprios extratos podem conter um acceptor competitivo com o acceptor natural do cloroplasto.

**Tabela 6: Efeito do extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sobre o rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas de aroeira.**

Concentração do extrato / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\Phi_{950 \text{ v}}$ (%)	$\Phi_{950 \text{ v}}$ (%) Luz (2min)
0	$2,6 \times 10^{-2}$ (100)	$3,2 \times 10^{-2}$ (100)
5	$2,2 \times 10^{-2}$ (84,7)	$2,6 \times 10^{-2}$ (81,4)
10	$2,0 \times 10^{-2}$ (77)	$2,3 \times 10^{-2}$ (72)
15	$2,6 \times 10^{-2}$ (100)	$2,9 \times 10^{-2}$ (90,8)
20	$2,4 \times 10^{-2}$ (92,4)	$2,8 \times 10^{-2}$ (87,6)

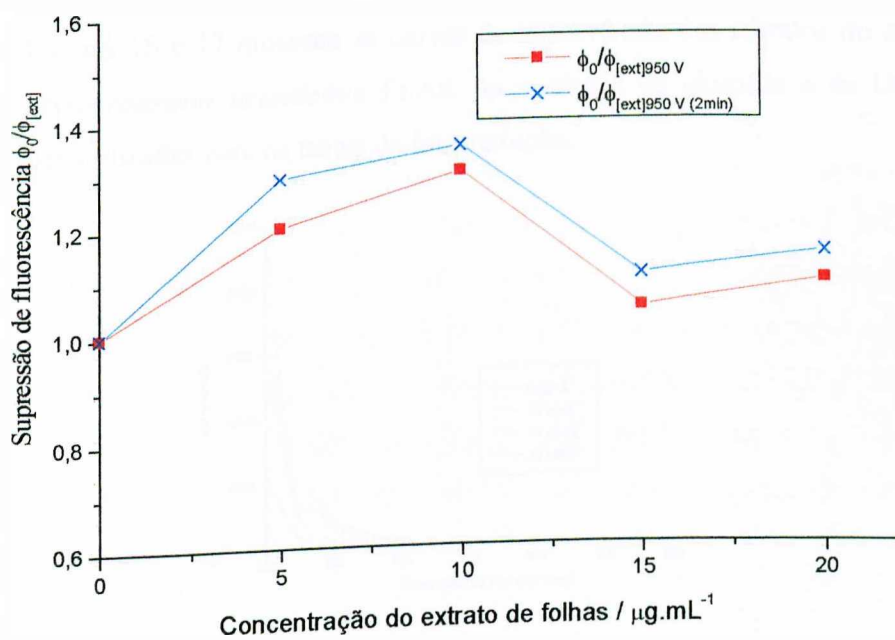


**Gráfico 7: Rendimento quântico de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.**

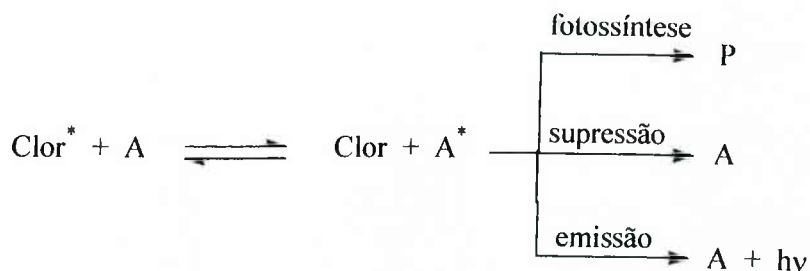


**Tabela 9: Supressão do rendimento quântico da fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas.**

Concentração do extrato / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\Phi_0 / \Phi_{[\text{ext}]}$ (950volts)	$\Phi_0 / \Phi_{[\text{ext}]}$ (950volts) Luz (2min)
0	1	1
5	1,2	1,3
10	1,3	1,3
15	1,0	1,1
20	1,1	1,1



**Gráfico 8: Supressão de fluorescência da clorofila frente ao extrato de folhas.**



onde: A = acceptor (acceptor natural do cloroplasto ou do extrato)  
P = produtos

### Esquema 1: Desativação de estados excitados de aceptores

Para uma decisão mais apurada sobre a influência do extrato do caule e da folha na fluorescência, tanto no fotossistema I quanto fotossistema II, são necessários estudos com fluorescência resolvida no tempo e a baixas temperaturas.

#### 4.3 – Medidas de fotorredução utilizando DCPIP

As Figuras 16 e 17 mostram as curvas de absorvância dos extratos do caule e de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. na ausência de clorofila e de DCPIP nas concentrações utilizadas para os testes de fotorredução.

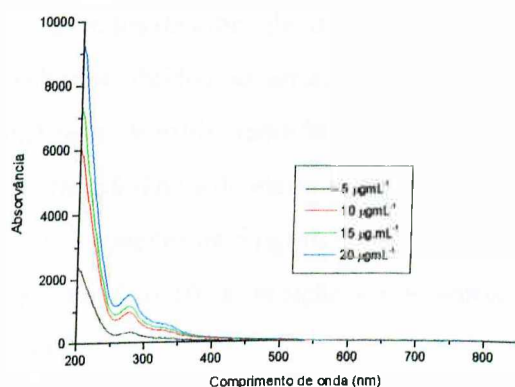
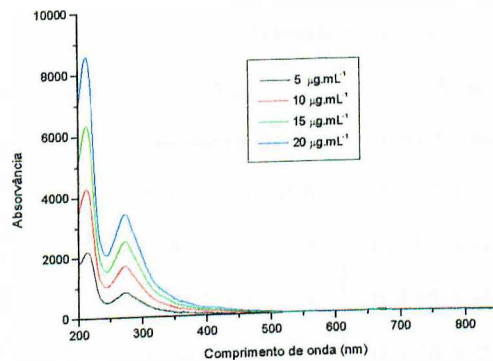


Figura 16 : Curva de absorvância do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.



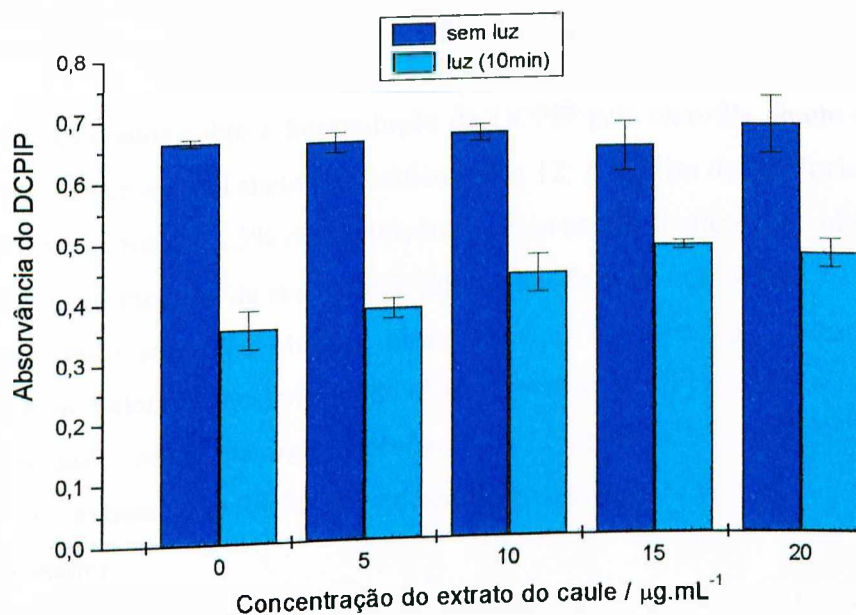
**Figura 17: Curva de absorvância do extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**

Na Tabela 8 e nos Gráficos 9 e 10, encontram-se os resultados obtidos na fotorredução do DCPIP frente ao extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.. A análise de variância foi feita pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância. Essa análise indicou que não há diferença significativa nas medidas de absorvância feitas antes de exposição à luz. No Gráfico 9 pode-se verificar que o DCPIP não sofre redução no escuro e que sua redução na presença de luz é influenciada diretamente pela concentração do extrato do caule. No Gráfico 9, observa-se a influência do extrato do caule sobre a diferença da absorção, na ausência e presença de luz do DCPIP, reforçando que o extrato do caule capta os elétrons advindos da clorofila, impedindo a fotorredução do DCPIP.

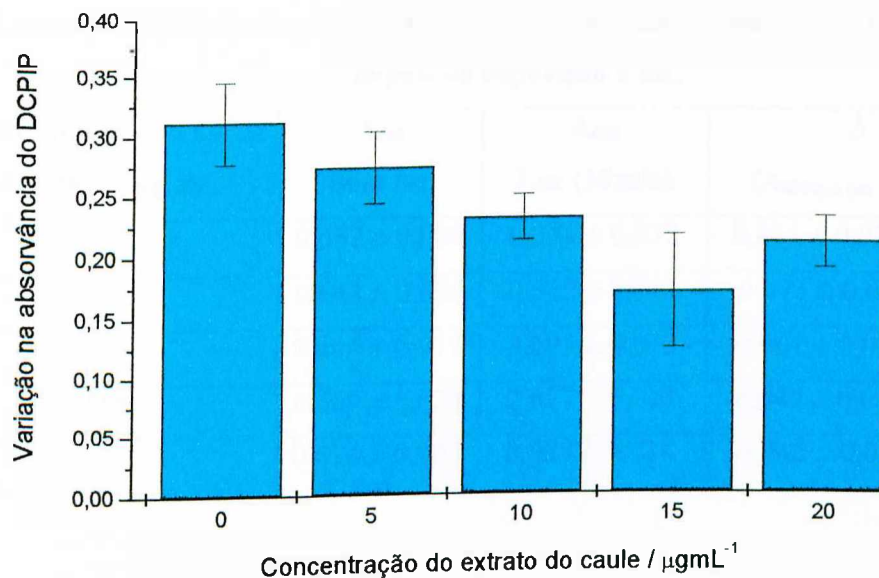
Analisando os resultados obtidos na variação de absorvância da mistura da reação de fotorredução do DCPIP pela clorofila, medida à 600 nm, observa-se que o extrato do caule provoca a inibição da transferência de elétrons da clorofila para o DCPIP, em todas as alíquotas, sendo que nas concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato do caule (Tabela 8 e Gráfico 10) a inibição foi de aproximadamente 12%, 25%, 45% e 32%, respectivamente.

**Tabela 8: Influência do extrato do caule sobre a fotorredução do DCPIP antes e depois de exposição à luz.**

Concentração do extrato do caule / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$A_{600}$ Ausência de luz	$A_{600}$ Luz (10min)	$\Delta$ (%) ( $A_{600\text{sem luz}} - A_{600\text{luz:10min}}$ )
0	$0,662 \pm 0,006$	$0,354 \pm 0,032$	$0,311 \pm 0,034$ (100 $\pm$ 10,9)
5	$0,657 \pm 0,016$	$0,383 \pm 0,016$	$0,273 \pm 0,030$ (87,8 $\pm$ 9,7)
10	$0,667 \pm 0,013$	$0,435 \pm 0,031$	$0,231 \pm 0,019$ (74,3 $\pm$ 6,1)
15	$0,640 \pm 0,040$	$0,478 \pm 0,007$	$0,170 \pm 0,046$ (54,7 $\pm$ 15,0)
20	$0,674 \pm 0,047$	$0,464 \pm 0,023$	$0,210 \pm 0,021$ (67,5 $\pm$ 4,6)



**Gráfico 9: Fotorredução do DCPIP pela clorofila sob a influência do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. \* A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste de Scott-Knott com 95% de confiança.**



**Gráfico 10 – Variação na absorvância da fotorredução do DCPIP, na ausência e presença de luz, na presença do extrato do caule de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**

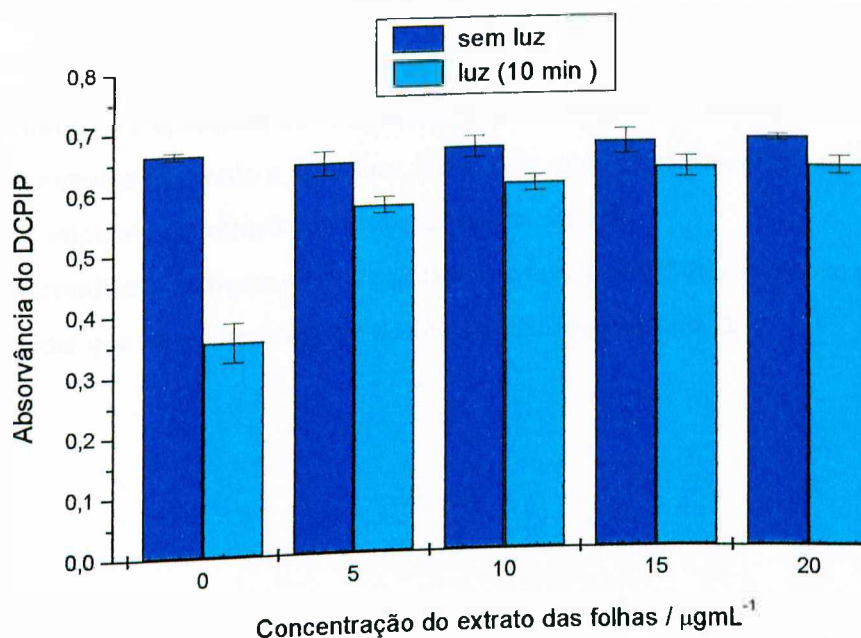
Os resultados sobre a fotorredução do DCPIP pela clorofila, frente ao extrato das folhas, encontram-se na Tabela 9 e Gráficos 11 e 12. A análise de variância foi feita pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância. Essa análise indicou que não há diferença significativa nas medidas de absorvância feitas antes de exposição à luz.

Analisando os dados obtidos, observa-se que o extrato das folhas causou uma inibição bem maior da transferência de elétrons para o DCPIP, quando se compara com o extrato do caule, sendo que nas concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato, a inibição foi de aproximadamente 77%, 80%, 87% e 86%, respectivamente.

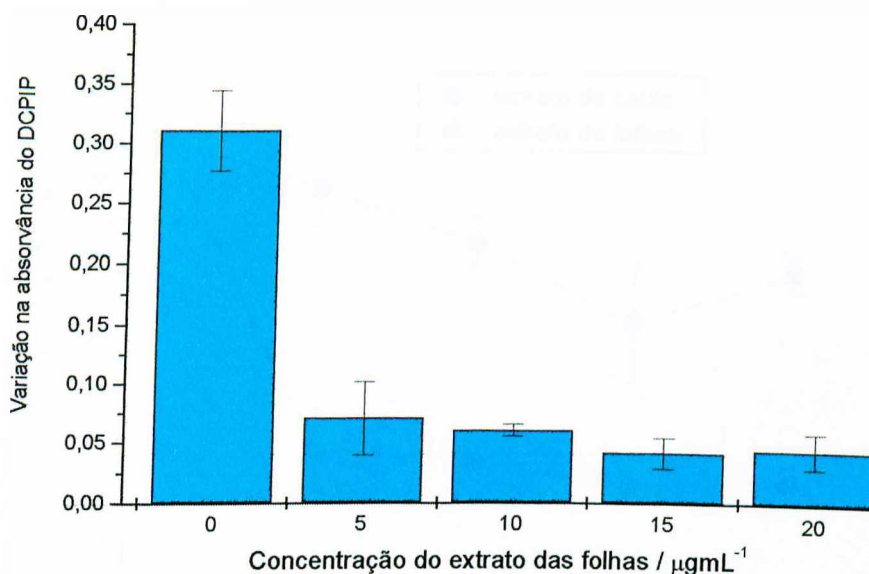
Através destes resultados pode-se afirmar que o extrato de folhas contém um componente que inibe fortemente a transferência de elétrons no fotossistema II e o de caule tem menor concentração deste componente.

**Tabela 9: Influência do extrato das folhas sobre a fotorredução do DCPIP antes e depois de exposição à luz.**

Concentração do extrato de folhas / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$A_{600}$ Sem luz	$A_{600}$ Luz (10 min)	$\Delta / (\%)$ ( $A_{600\text{sem luz}} - A_{600\text{luz:10min}}$ )
0	$0,662 \pm 0,006$	$0,354 \pm 0,032$	$0,311 \pm 0,034$ (100 $\pm$ 10,9)
5	$0,643 \pm 0,020$	$0,572 \pm 0,013$	$0,071 \pm 0,031$ (22,8 $\pm$ 10)
10	$0,664 \pm 0,017$	$0,603 \pm 0,013$	$0,061 \pm 0,005$ (19,6 $\pm$ 1,6)
15	$0,669 \pm 0,020$	$0,627 \pm 0,017$	$0,042 \pm 0,013$ (13,5 $\pm$ 4,2)
20	$0,674 \pm 0,005$	$0,629 \pm 0,014$	$0,045 \pm 0,015$ (14,5 $\pm$ 4,8)



**Gráfico 11: Fotorredução do DCPIP pela clorofila sob a influência do extrato das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. \*A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste de Scott-Knott com 95% de confiança.**

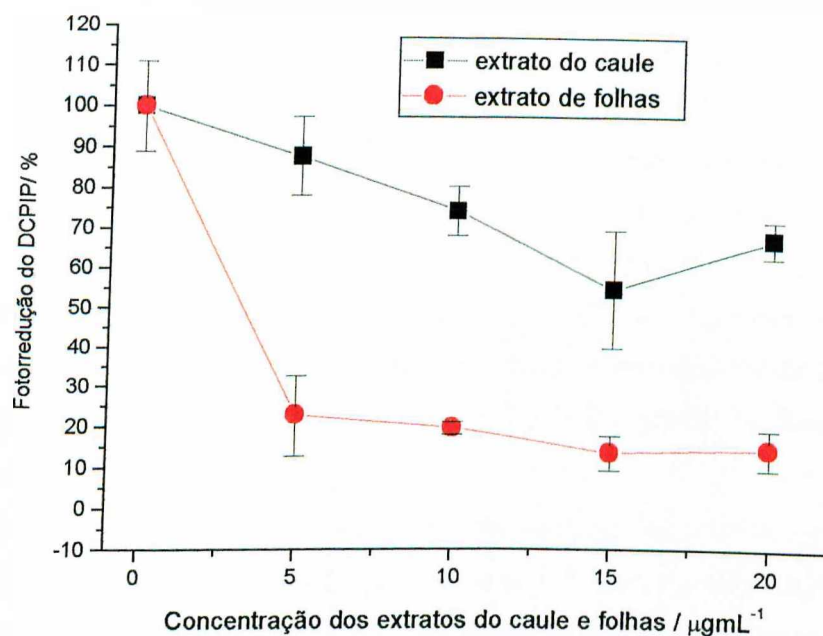


**Gráfico 12 – Variação na absorvância da fotorredução do DCPIP, na ausência e presença de luz, na presença do extrato das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**

O Gráfico 13 apresenta os resultados da porcentagem de fotorredução do DCPIP para os dois extratos, de caule e de folhas, indicando comparativamente, que o extrato de folhas é mais eficiente na inibição da fotorredução do DCPIP.

Estes resultados indicam que os extratos do caule e das folhas possuem pelo menos um componente que atue como acceptor de elétrons no fotossistema II.





**Gráfico 13: Porcentagem de fotorredução do DCPIP, na presença dos extratos do caule e de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All.**



**CONCLUSÕES E  
TRABALHOS FUTUROS**

## 5 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Nos testes de pré-emergência observou-se que o extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. inibiu significativamente a germinação de soja, na concentração de  $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (32%) e braquiária na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (50%). O extrato do caule inibiu a germinação da soja nas concentrações de  $1,0$  (67%) e  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (71%) e estimulou a germinação do feijão na concentração de  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (125%). Portanto, o extrato do caule não deve ser usado como inibidor da germinação de plantas daninhas, uma vez que ele inibiu a germinação da braquiária na concentração de  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (64%) mas estimulou a germinação na concentração de  $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (150%) e tem ação inibitória sobre a soja e o feijão.

Esta característica do extrato provocar inibição da germinação numa determinada concentração, e em outra concentração estimular a germinação, também foi observada por Leather [70], citado por Almeida [6], em experimentos onde testou o efeito de extratos aquosos de folhas e caules de 13 espécies de cultivares de girassol, em 17 espécies de plantas silvestres. Ele verificou que a germinação da mostarda-brava (*Brassica Kaber*) foi reduzida em média 75% quando usou extrato puro das folhas de girassol, mas que a estimulou em 150% quando o diluiu a mais de 10%, sendo que os extratos do caule, em qualquer das concentrações testadas sempre estimularam a germinação [6].

O extrato de folhas inibe a germinação da braquiária na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sem afetar a germinação das culturas, podendo, portanto, ser utilizado nesta concentração para o combate da germinação da braquiária nas plantações de soja, feijão e arroz. (Estudos em campo devem ser realizados).

O metabólito secundário *p*-hydroxyacetophenone isolado de *Chilean baccharis*, inibiu 50% da germinação de *lettuce sativa*, uma monocotiledônea, na concentração de  $45,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  [68]. O extrato de folhas de *Myracrodruon urundeuva* também inibiu a germinação de uma monocotiledônea, a *Brachiária brizantha* (braquiária), em 50%. Considerando que o extrato contém vários componentes e que o princípio ativo que causa esta inibição está em quantidades ínfimas, é promissora a busca deste princípio

ativo, uma vez que ele causa um efeito semelhante ao da substância pura *p*-hidroxiacetofenona, porém em concentrações muito menores. Testes de germinação utilizando outras plantas devem ser feitos.

Nos testes de medidas de fluorescência, os gráficos do rendimento quântico mostram que os extratos de folhas e de caule provocam uma alteração no rendimento quântico de fluorescência da clorofila. A desativação do acceptor de elétrons do meio reacional pode estar seguindo, na presença dos extratos, dois caminhos, a saber, supressão por desativação de estados excitados, onde a energia pode estar sendo dissipada na forma de calor (folha) e emissão de luz aumentando o rendimento quântico (caule). Medidas de fluorescência utilizando os métodos de fluorescência resolvida no tempo e de pulso e variação de temperatura devem ser feitas para melhorar os resultados e buscar definir o mecanismo de ação dos extratos sobre a fluorescência da clorofila.

Os testes da fotorredução do DCPIP mostram claramente que os extratos de folhas e do caule bloqueiam a transferência de elétrons da clorofila para o DCPIP, em todas as concentrações testadas, diminuindo a atividade da clorofila em de mais de 50%, no caso do extrato de folhas.

Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos para o calacol isolado de *Psacalium decompositum* Gray [10], verifica-se que o extrato de folhas tem um efeito maior na inibição da transferência de elétrons do PSII para o DCPIP nas concentrações de  $5,0 \mu\text{gmL}^{-1}$  (22,8%),  $10 \mu\text{gmL}^{-1}$  (19,6%),  $15 \mu\text{gmL}^{-1}$  (13,5%) e  $20 \mu\text{gmL}^{-1}$  (14,5%) que o calacol na concentração de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (50%). O extrato do caule também inibe essa transferência de elétrons, mas em menor proporção que o de folhas, não atingindo o valor de 50% em nenhuma das concentrações utilizadas.

Conclui-se então que o extrato de folhas contém ao menos um componente com atividade muito forte que bloqueia a reação de Hill, no fotossistema II e, portanto, pode ser um herbicida potencial.

Experimentos futuros devem ser feitos fracionando-se os extratos para identificar o ou os componentes com atividade herbicida.

Assim, é possível avaliar uma determinada planta quanto ao seu potencial herbicida já no extrato cru e, posteriormente, usar de técnicas mais apuradas e direcionadas para identificar seus componentes ativos e seu mecanismo de ação.

**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

**6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1- CRUZ, J. C.; MONTEIRO, J. <sup>o</sup>; SANTANA, D. P., Garcia, J. C.; Bahia, F. G. F. T. C.; SANS, L. M.; PEREIRA FILHO, I. A. e colaboradores; “Agricultura real – Produtividade e Renda. Recomendações técnicas para o cultivo do milho”. EMBRAPA, SPI, Brasília – DF. 2<sup>a</sup> ed., 1996.
- 2- MAROCHI, A. I. “Pontos chaves para o sucesso de aplicações de herbicidas”. Mesa Redonda VI.3, XXI CBCPD, Caxambu-MG, 6 à 11 de julho de 1997.
- 3- SAAD, O.; “A vez dos Herbicidas”. 2 ed., Livraria Nobel, São Paulo, 1978.
- 4- BAIRD, C. “Química Ambiental”. Bookman 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, 2002.
- 5- SILVA, Antônio A. ; DOMINGOS, Mpanzo; CARDOSO, Antônio A. “Efeitos do Paraquat e da mistura paraquat+diquat como dessecantes, aplicados em diferentes épocas, no rendimento e na qualidade fisiológica das sementes de feijão”. REVISTA CERES. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1999, 265,239-250.
- 6- ALMEIDA, F. S. “A Alelopatia e as plantas”. circular nº 53, IAPAR, Londrina – PR, 1988.
- 7- HIRATA, R. “Piretróides: Estrutura química – atividade biológica”. Química Nova, 1995, 18, 368-374.
- 8- ELLIOTT, M.; JANES, N. F.; POTTER, C.; Ann. Rev. Entomol. 1978, 23, 443.
- 9- HIPKINS, M. F.; BAKER, N. R., editors; “Photosynthesis energy transduction: a practical approach”, IRL PRESS, Washington DC, 1986.

- 10- MACIAS, Martha L.; ROJAS, Irma S.; MATA, Rachel, and LOTINA-HENNSSEN, Blas. Effect of selected coumarins on spinach chloroplast photosynthesis. *J. Agric. Food Chem*, 1999, 47, 2137-2140.
- 11- NETZLY, D. H., L. G. Roots of sorghum exsude hydrophobic droplets containing biologically active components. **1986**, *Crop Sci.*, 26, 775-778.
- 12- NETZLY, D. H.; BUTLER, L. G.; “Roots of Sorghum Exude Hydrophobic Droplets Containing Biologically Active Components”. *Crop Science*, **1986**, 26, 775-778.
- 13- EINHELLIG, F. A.; SOUZA, I. F.; “Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates”. *J. Chem. Ecol.*, **1992**, 18, 1.
- 14- EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A.; HEJL, A. M; SOUZA, I. F. “Effects of root exudate sorgoleone no photosynthesis”. *J. Chem. Ecol.*, **1993**, 19, nº 2 , 369-375.
- 15- GONZALEZ, V. M.; KAZIMIR, J.; NIMBAL, C.; WESTON, L. A.; CHENIAE, G.M.; “Inhibition of a Photosystem II Electron Transfer Reaction by the Natural Product Sorgoleone”. *J. Agric. Food Chem*. **1997**, 45, 1415 – 1421.
- 16- FERREIRA, M. L.; “Síntese e avaliação da atividade herbicida de quinonas”, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, **1998**, Dissertação de Mestrado.
- 17- CAMARGO, P. N.. “Herbicidas orgânicos – Fundamentos Químico-Estruturais”. 1ª edição, Editora Manole LTDA, São Paulo – Brasil, **1986**,.
- 18- KLECKOWSKI, L.A.; “Inhibitors of photosynthetic Enzymes/Carriers and Metabolism”. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1994**, 45, 339-367.
- 19- LEHNINGER, A . L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. “Lehninger-Princípios de Bioquímica”. 3ª ed., Editora Sarvier, São Paulo, **2002**.

- 20- CAMPBELL, M. K. "Biochemistry". 2a. edit., Saunders College Publishing. USA, **1995**.
- 21- TAIZ, L., ZEIGER, E.; "Plant Physiology". 3rd ed, Sinauer Associates Publishers, Massachusettes, USA , **2002**.
- 22- ALMEIDA, F. S.; "Guia de herbicidas". LIVROCERES, Piracicaba – SP, **1988**.
- 23- PFANNSCHMIDT, T.; "Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes". TRENDS Plant Science, 2003, 8, 33-41.
- 24- STRYER, L.; "Bioquímica". Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, **1996**.
- 25- MILLS, J. D.; MITCHELL, P.; SHÜRMANN, P.. "Modulation of coupling factor ATP-ase ativity in intact chloroplasts". FEBSLETTERS, **1980**, 22, 173-177.
- 26- RASHID, A.; CAMM, E. L.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M.; "Molecular mechanism of action of Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on water oxidizing complex of photosystem II". FEBS LETTERS, **1994** , 350, 296-298.
- 27- GROVE, G. N.; BRUDVIG, G. W.; "Calcium Binding Studies of Photosystem II using a Calcium-Selective Electrode". Biochem., **1998**, 37, 1532-1539.
- 28- VRETTOS, J. S.; STONE, D. A.; BRUDVIG, G.; "Quantifyng the Ion Selectivity of the Ca<sup>2+</sup> Site in Photosystem II: Evidence for Direct Involvement of Ca<sup>2+</sup> in O<sub>2</sub> Formation". Biochem., **2001**, 40, 7937-7945.

- 29- PUTNAM, A. R. "Allelopathic chemicals – Nature's herbicides in action" Special Report, C&EN, Revista distribuída pela American Chemical Society, N.W., Washington, 1983, 4, 34 – 45.
- 30- MACIAS, F. A.; GALINDO, J.; C.G.; MOLINILLO, J. M. G.; CASTELHANO, D.; "Dehydrozaluzanin C; a potent plant growyh regulator with potential use as a natural herbicide template", 2000, 54, 165-171.
- 31- ABREU, J. C.; "Potencial alelopático do angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Spig): Efeitos sobre a germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e cancfistula ( *Peltophorum dubium* (Spreng.)Taub.)". Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 1997, Dissertação de Mestrado.
- 32- STREIBIG, J. C.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S.; "Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors". Pestic. Science. 1999, 55, 137-146.
- 33- HALLAK, Â. M. G.; "Efeito de exsudatos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre a divisão celular e anatomia de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)"; Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 1996, Dissertação de Mestrado.
- 34- RASMUSSEN, J. A.; HEJL, Â. M.; EINHELLIG, F. A.; THOMAS, J. A.; "Sorgoleone from root exudates inhibts mitochondrial functions". J. Chem. Ecol., 1992, 18, 197-207.
- 35- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J.; "Sementes: Ciência tecnologia e produção". Fundação Cargil , Campinas – SP, 1980.
- 36- RASHID, A.; POPOVIC, R.; "Electron donation to photosystem II by diphenylcarbazide is inhibited both by the endogenous manganese complex and by exogenous manganese ions". Biochem. Cell. Biol., 1995, 7, 241-245.



- 37- GHIRARDI, M. L.; LUTTON, T. W.; SEIBERT, M.; "Interactions between Diphenylcarbazide, Zinc, Cobalt, and Manganese on the Oxidizing Side of Photosystem II". *Biochemistry*, **1996**, 35, 1820-1828.
- 38- YRUELA, I.; PUEYO, J. J.; ALONSO, P. J.; PICOREL, R.; "Photoinhibition of Photosystem II from Higher Plants". *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 27408-27415.
- 39- [http://www.ualr.edu/~botany/photosynthesis\\_lab.html](http://www.ualr.edu/~botany/photosynthesis_lab.html); "The Hill Reaction". Acesso em 01/01/2004;
- 40- STRAIN, H. H.; COPE, B. T.; SVEC, W. A.; "Analytical Procedures for the Isolation, Identification, Estimation, and Investigation of the Chlorophylls. In *Methods of Enzymology*". Academic Press, NY, **1971**, 23, 452-476.
- 41- ARNON, D.; "Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris", *Plant Physiol.*, **1949**, 24, 1-15.
- 42- <http://www.cnpms.embrapa.br/nucleos/nea/pesquisa/gest002.html>; Acesso em **12/12/2002**.
- 43- KRAUSE, G.H.; VERNOTTE, C.; BRIANTAIS, J.M.; "Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae", *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 679, 116-124
- 44- HORTON, P.; "The effect of redox potencial on the kinetics of fluorescence induction in pea chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 637, 152-158.
- 45- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C.; "Chlorophyll fluorescence as a non-destructive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis". *Ecol. Stud.*, **1994**, 100, 49-70.

- 46- DUYSSENS, L. N. M.; SWEERS, H.E.; "In Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria". University of Tosyo Press, Tokyo, **1963**.
- 47- MELIS, A.; HOMAN, P. H.; "Heterogeneity of the Photochemical centers in system II of chloroplasts". *Photochem. Photobiol.*, **1976**, 23, 343-350.
- 48- HARRIS, D. C.; "Análise Química Quantitativa". 5ª edição, LTC. S.A., Rio de Janeiro - RJ, **2001**.
- 49- WEIS, Engelbert and BERRY, Joseph A.; "Quantum efficiency of photosystem II em relation to "energy"-dependent quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta* 894, **1987**, 198-208.
- 50- ZARCO-TEJADA, P.J; PUSHNIK, J.C.; DOBROWSKI, S.; USTIN, S.L.; "Steady-state chlorophyll a fluorescence detection from canopy derivative reflectance and double-peak red-edge effects". *Rem. Sens. Environm.*, **2003**, 84, 283-294.
- 51- Eaton, D. F. "Referen e materials for fluorescence measurement". *Pure & Appl. Chem.*, **1988**, 60, 1107-1114.
- 52- LORENZI, H.; "Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil". Editora Plantarum, Nova Odessa, SP., **1992**.
- 53- CORRÊA, M. P.; "Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas". Rio de Janeiro. Imprensa Nacional,. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 6, **1984**.
- 54- RIBEIRO, J.H.; "Aroeira durável além de uma vida". *Revista Globo Rural*, **1989**, 49, 85-90.

- 55- MORAES, M.L.T; FREITAS, M . L. M.; Resumos Embrapa-CPAO/Flora Sul, Dourados-MS, 9, 1997.
- 56- SCHULTZ, A .; “Introdução à botânica sistemática”. .5ª edição, Sagra: Editora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 1, 1990.
- 57- Dod, B.; Haynes, B., editors; “Flowering Plants of the world”. Oxford University Press, New York, 1996.
- 58- MELO, J. T.; “AROEIRA: características e aspectos silviculturais”. EMBRAPA-CPAC, Planaltina-DF, 1991.
- 59- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DRUMOND, M. G.; “Studies on Polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* Wood”. J. Braz. Chem. Soc., 1999, 10, 6, 447-452.
- 60- AMADIOHA, A. C.; “Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*”. Crop Protect , 2000, 19, 287-290.
- 61- COUTINHO, W. M; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F. H. L.. “Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)”. Ciênc. e Agrotec., Lavras, 1999 23, 560-568.
- 62- BRACCINI, A . L. ; SCAPIM, C. A .; OLIVEIRA, V. R.; BACCINI, M. C.; “Superação de dormência em sementes de capim braquiária”, Acessado em 18/09/2002, <http://www.cca.uem.br/anu9800.htm> .
- 63- DANTAS, A . M.; SOARES, A . A . G.; FOLLE, A . D.; COSER, C. A .; MENDONÇA, L. A .; SOUZA, L. M.; MAIA, N. B.; SILVA, P. C. D.; VALE, R.;

- “Regras para análise de sementes”. Coordenação de laboratório vegetal – CLAV. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília, **1992**.
- 64- GALINDO, J. C. G.; LUKE, A . P.; JORRIN, J.; MACIAS, F.; “SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobancha cumana* seed germination stimulants”. J. Agric. Food Chem., **2002** , 50 , 1911-1917.
- 65- RIMANDO, A. M.; DAYAN, F. E.; CZARNOTA, M. A.; WESTON, L. A.; DUKE, S. O. A.; “New Photosystem II Electron Transfer Inhibitor from Sorghum bicolor”. J. Nat. Prod, **1998**, 61, 927 – 930.
- 66- PASSOS, L. P.; “Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal”; EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco – MG, **1996**.
- 67- CILENTO, G.; ZINNER, E. J.; BECHARA, H.; DURÁN, N.; BAPTISTA, R.C.; SHIMIZY, Y.; AUGUSTO, O.; FALJONI-ALÁRIO, A.; VIDIGAL, C.C.C.; FARIA-OLIVEIRA, O . M. M.; HAUN, M. *Ciência e Cultura*, **1979**, 31, 290.
- 68- CÉSPEDES, C. L.; UCHOA, A.; SALAZAR, J. R.; PERICH, F.; and PARDO, Fernando. “Plant Ground Inhibitory Activity of p-hdroxyacetophenones and Tremetones from Chilean Endemic Baccharis Species and some Analogous: A Comparative Study”. J. Agri. Food Chem. **2002** , 50 , nº 8, 2283-2292.
- 69- <http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/FOTO12.htm> Acesso em 17 de abril de **2004**.
- 70- LEATHER, G.R. Sunflowers (*Helianthus annuus*) are allelopathic to weeds. *Weed Science*, 31: 37-42, **1983**.



**Universidade Federal de Uberlândia**

**Instituto de Química**

Av. João Naves de Ávila no. 2160 - Bairro Santa Mônica - Uberlândia - MG - Brasil  
Fones: (xx34) 3239 4143 e 3239 4174; Fax: (xx34) 3239 4208

A Profª. Adriane Petronilha Macedo, aluna de mestrado da Profª. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado, lotada no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, não está mais entre nós. Vítima de uma leucemia mielóide aguda M1, sua vida foi ceifada aos recém atingidos 34 anos, no dia 24 de janeiro de 2004.

A Profª. Adriane, junto com os outros colegas do grupo de pesquisa coordenado pela Profª. Sandra, desenvolveu um excelente trabalho sobre a influência na fotossíntese e germinação de culturas e plantas daninhas, dos extratos do caule e das folhas da planta *Cochlospermum regium* (algodãozinho), coletada do sítio do Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira. Seu trabalho teve várias apresentações em eventos científicos, inclusive trabalhos completos.

A Profª. Sandra deixava sob a responsabilidade da Profª. Adriane todo o procedimento para a participação em eventos científicos e apresentação do trabalho em empresas, desde a escrita dos trabalhos a serem apresentados até mesmo a reserva de passagens aéreas. Um “braço direito” da Profª. Sandra.

A garra e a força de trabalho da Profª. Adriane merecem destaque e não podem ficar esquecidas apenas porque ela não mais está entre nós.

Considerando isto, a Profª. Sandra e sua equipe de trabalho decidiram inserir, logo após o trabalho da Profª. Cléia, o trabalho da Profª. Adriane, na sua primeira versão, sem qualquer correção por parte da Profª. Sandra, uma vez que a Adriane não está mais junto de nós para opinar o sobre o seu trabalho. A última versão seria entregue e discutida com a Adriane nos dias em que a doença foi manifestada e não nos foi entregue. Apresentamos também alguns dos trabalhos que foram apresentados, entre eles o da ANBIO e da ABRABI.

Para o nosso grupo de pesquisa, é como se ela estivesse presente, apresentando o seu trabalho para a sua participação no exame de qualificação e defesa da dissertação..

Este é o nosso ato simbólico de que, para nós, a Profª. Adriane Petronilha Macedo, está qualificada para a sua defesa de Dissertação de Mestrado e lhe conferimos, simbolicamente o título de Mestre em Química.

Nossas saudades.

**Estudos dos extratos metanólicos do caule e de folhas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho) sobre cloroplastos de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) e sobre a germinação de sementes de algumas culturas e plantas daninhas.**

**Adriane Petronilha Macedo**

***1969 - 2004***

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Terezinha de Farias Furtado**

**Uberlândia –MG**

***Fevereiro de 2004***

# ATIVIDADES HERBICIDAS COMO DIAGNÓSTICO NA GERMINAÇÃO DE CULTURAS E ESTUDOS SOBRE A FOTOSÍNTESE. I- OS RESULTADOS DO EXTRATO DA FOLHA DO *COCHLOSPERMUM REGIUM* (ALGODÃOZINHO) SOBRE A GERMINAÇÃO DO *ZEA MAYS* (MILHO), *GLYCINE MAX* (SOJA), *PHASEOLLUS VULGARIS* (FEIJÃO), *ORYZA SATIVA* (ARROZ).

Adriane Petronilha Macedo<sup>1</sup> (PG), Sandra Terezinha de Farias-Furtado<sup>1\*</sup> (PQ), Carlos Alberto de Oliveira<sup>1</sup> (PQ), Cléia Regina Fuchs<sup>1</sup> (PG), Maria Isabel Ribeiro Alves<sup>1</sup> (IC), Eduardo Borgato Barbedi<sup>1</sup> (IC).

1- Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia, \*

[sffurtado@ufu.br](mailto:sffurtado@ufu.br).

## Introdução

O extrato da raiz do *Cochlospermum regium* apresenta atividade antimicrobiológica sobre certas bactérias, propriedades analgésicas e antiedema e seu extrato é rico em taninos, saponinas e flavonóides<sup>1</sup>. O estudo da interação química entre as plantas pode ter outras utilidades, sendo importante no desenvolvimento de uma nova classe de herbicidas naturais mais suaves<sup>2</sup>. Nos propomos a estudar a provável potencialidade herbicida do extrato das folhas do *Cochlospermum regium* como um diagnóstico na pré - emergência e sobre a fotossíntese. Apresentamos neste trabalho, estudos utilizando a técnica UV/Vis, fluorescência e germinação da semente de *Zea mays* (milho), *Glycine max* (soja), *Phaseollus vulgaris* (feijão), *Oryza sativa* (arroz).

## Resultados e Discussão

As germinações foram realizadas em placa de petri de 9 cm de diâmetro, em triplicatas, usando uma germinadora com controle de temperatura em 25 °C. As concentrações de extrato das folhas do *Cochlospermum regium* usadas foram 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 µg/mL. Na germinação das sementes de milho (Figura 1), observou-se uma estimulação na germinação de 28,57% (15 µg/mL) , quando comparado com zero de extrato. Na Figura 2, os resultados da germinação da *Glycine max* sob o efeito do extrato, indicam que houve uma inibição de 24% sobre a mesma, na concentração de 2 µg/mL. Na Figura 3, observa-se um estímulo da germinação do *Phaseollus vulgaris* na presença do extrato. Estudos posteriores devem ser realizados para identificar a causa de tal estímulo, principalmente quanto à saúde da planta. Na Figura 4, germinação da *Oriza sativa*, verifica-se um fraco efeito do extrato, tanto de inibição quanto de estímulo.

Nos estudos sobre a fotossíntese, trabalhou-se com cloroplastos extraídos de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). Eles foram ressuspensos em meio reacional e a clorofila foi quantificada<sup>3</sup>. Nas soluções contendo 20 µg de clorofila e meio reacional foram adicionadas alíquotas da solução aquosa do extrato metanólico das folhas do *Cochlospermum regium*. Estas alíquotas foram de 0 a 10 µg/mL, para UV/Vis, 0 a 20 µg/mL para fluorescência e pré emergência. A absorção da clorofila monitorada no visível ocorreu na presença e ausência de luz. Observa-se na Figura 5, que a absorção da clorofila é praticamente a mesma, tanto na

presença quanto na ausência de luz. Com  $1\mu\text{g/mL}$  de extrato, observou-se uma queda na absorbância da clorofila de 11,3% no escuro e 10,5% no claro. Na Figura 6, observa-se que o extrato inibe a fluorescência da clorofila de forma semelhante ao herbicida Metil Viologen (MV).

### Conclusões

O extrato metanólico das folhas do *Cochlospermum regium* apresenta um efeito herbicida pequeno sobre a absorbância da clorofila, mas interfere significativamente na fluorescência das mesmas. Porém, na germinação da soja atua com inibição em todas as concentrações, atingindo um máximo de 24%. Nas outras culturas, a inibição é menos acentuada, com um máximo de 12,5% na germinação da semente de *Oriza sativa*; observou-se também um efeito de estimulação máxima de 26% na germinação de *Phaseollus vulgaris*.

Figura 1. Porcentagem de germinação da semente *Zea mayz* frente ao extrato das folhas do *Cochlospermum regium*.

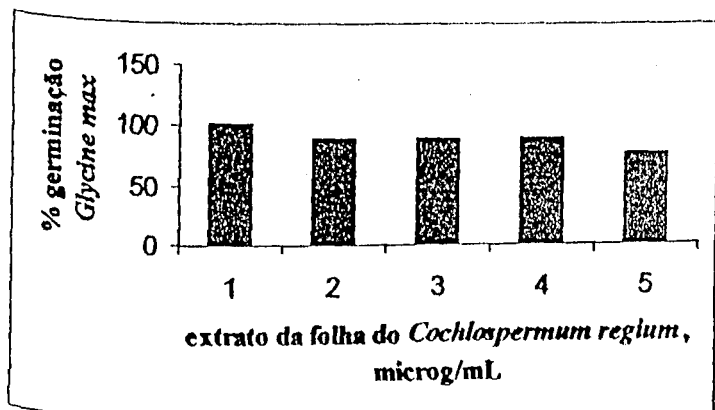
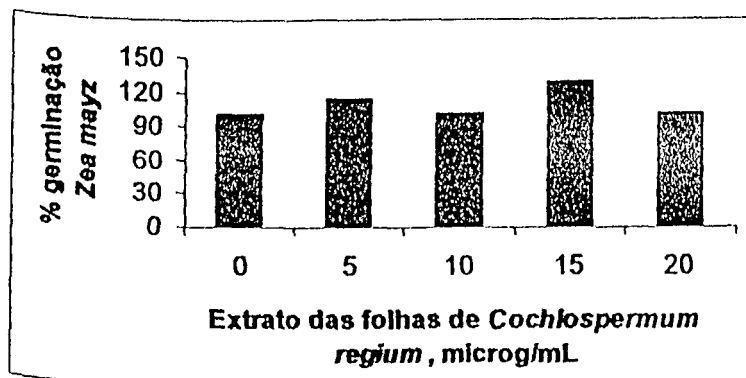


Figura 2. Porcentagem de germinação da semente *Glycine max* frente ao extrato das folhas do *Cochlospermum regium*.



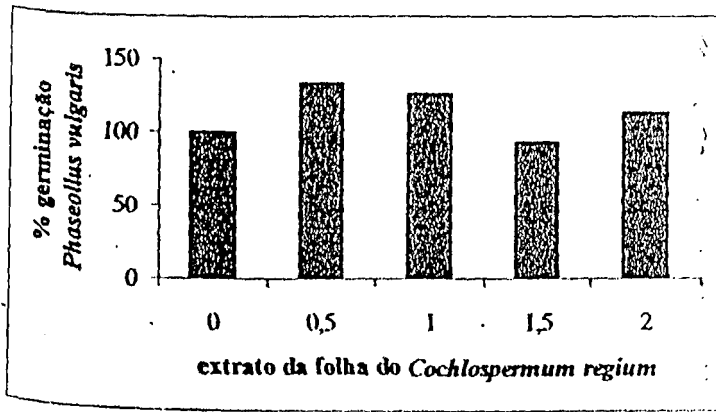


Figura 3. Porcentagem de germinação da semente *Phaseolus vulgaris* frente ao extrato das folhas do *Cochlospermum regium*.

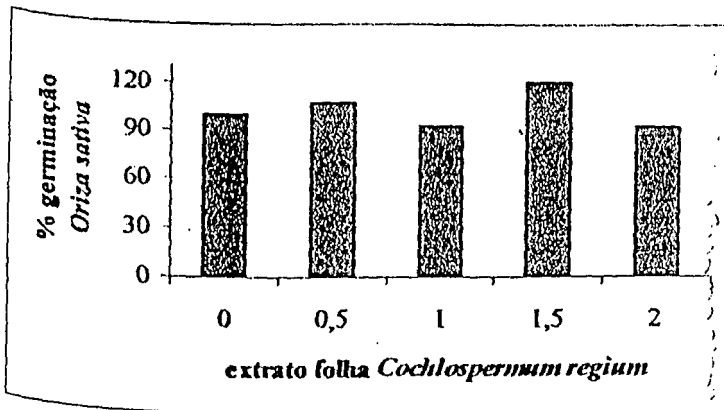


Figura 4. Porcentagem de germinação da semente *Oriza sativa* frente ao extrato das folhas do *Cochlospermum regium*.

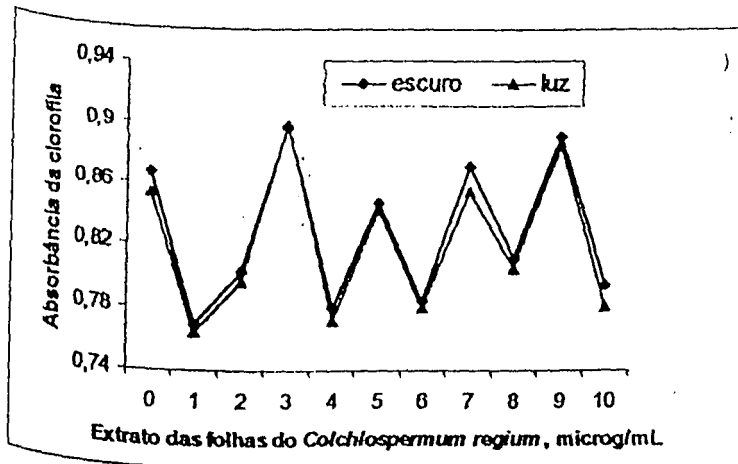


Figura 5. Absorbância da clorofila frente ao extrato das folhas do *Colchlospermum regium*, na ausência (losango) e na presença (triângulo) de luz.

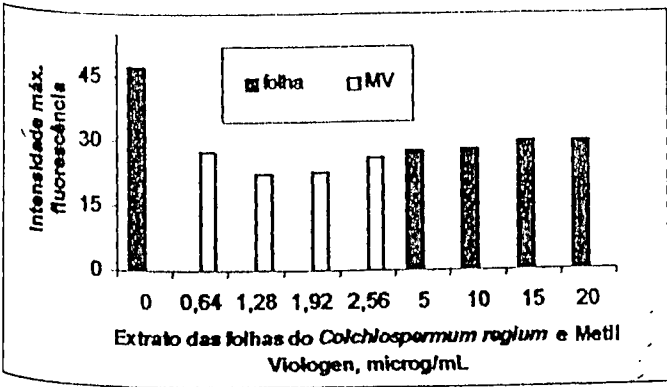


Figura 6. Intensidade máxima de fluorescência da clorofila frente ao extrato das folhas do *Cochlospermum regium* e Metil Viologen (MV).

**Bibliografia**

- <sup>1</sup> Toledo, M.I.; Siqueira, J.M.; Araújo, L.C.L. e Oga, S.; *Phytoter. Res.* 2000, 14, 359-361.
- <sup>2</sup> Macias, F.A; Galindo, J.C.G; Molinillo, J.M.G e Castellano, D.; *Phytochem.* 2000, 54, 165-171.
- <sup>3</sup> Castañeda, P.; Mata, R.. e Lotina-Hennsen, B.; *J. Sci. Food. Agric.* 1998, 78, 102-108.

**Agradecimentos**

Agradecimentos ao CNPq pelo apoio concedido no Programa Centro – Oeste.

**POTENCIAL BIOHERBICIDA DO EXTRATO DAS FOLHAS DO *Cochlospermum regium* NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Glycine max*, *Phaseollus vulgaris* e *Portulaca oleracea*.**

**Sandra Terezinha de Farias-Furtado\* (PQ), Carlos Alberto de Oliveira (PQ), Adriane Petronilha Macedo (PG), Cléia Regina Fuchs (PG), Eduardo Borgato Barbedi (IC).**

Instituto de Química – Universidade Federal de Uberlândia; [\\*sffurtado@ufu.br](mailto:sffurtado@ufu.br)

**OBJETIVO:** Determinar o potencial herbicida do extrato das folhas do *Cochlospermum regium* na germinação de sementes, crescimento da radícula e hipocótilo de *Glycine max*, *Phaseollus vulgaris*) e *Portulaca oleracea*.

**METODOLOGIA:** As sementes foram selecionadas e lavadas em solução de NaClO à 10%. A germinação foi feita em placas de Petri contendo papel de filtro, água deionizada e extrato (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em cada placa foram colocadas 25 sementes de beldroega e 10 sementes de soja e feijão, todos em triplicata. As sementes ficaram, em germinadora esterelizada, por 7 dias, no escuro e à 25°C.

**RESULTADOS:** Na germinação da soja, observou-se uma redução de 18%, na porcentagem de germinação na concentração de 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; para o feijão e beldroega não houve um efeito inibitório significativo, comparado com o zero de extrato. Houve um efeito inibitório significativo de 30%, para o crescimento da radícula e do hipocótilo para a beldroega.

**CONCLUSÃO:** o extrato das folhas do *Cochlospermum regium* apresenta um efeito herbicida pequeno sobre a germinação da soja, no entanto, apresenta um efeito herbicida considerável, para o crescimento da radícula e do hipocótilo da beldroega, planta que é considerada daninha em vários tipos de culturas.

[CNPq / Programa Centro-Oeste]



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HERBICIDA DO  
EXTRATO DAS FOLHAS E DO CAULE DO  
*Cochlospermum regium***

**Adriane Petronilha Macedo**

**Uberlândia, fevereiro de 2003.**

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HERBICIDA DO  
EXTRATO DAS FOLHAS E DO CAULE DO  
*Cochlospermum regium***

***DISSERTAÇÃO DE MESTRADO***

**Adriane Petronilha Macedo**

**INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
UBERLÂNDIA - MG  
2003**

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HERBICIDA DO  
EXTRATO DAS FOLHAS E DO CAULE DO  
*Cochlospermum regium***

**Adriane Petronilha Macedo**

**Orientador: Professora Sandra Terezinha de Farias-Furtado**

**Dedico esta dissertação de mestrado ao meu companheiro tão querido Célio, que direta ou indiretamente contribuiu para a execução deste trabalho.**

## Prefácio

O propósito desta dissertação é apresentar e discutir os resultados das investigações realizadas em dois anos de pesquisa na área de bioinorgânica, visando uma abordagem concisa e didática.

O objetivo principal desta dissertação é atingir um público bastante amplo nas áreas de química, biologia e outras correlacionadas, como também contribuir para estudos correlacionados nesta área de pesquisa.

A forma de organização e execução dos experimentos, foi estabelecida procurando uma seqüência científica lógica, buscando também uma interdisciplinaridade com as outras áreas do conhecimento.

Uberlândia, 2003  
A autora.



## Agradecimentos

O apoio técnico e financeiro do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia e do apoio concedido pelas agências de fomento CAPES/CNPQ.

Tive o imenso prazer de trabalhar com a professora Sandra, a qual quero destacar meus agradecimentos pela pessoa tão especial que é, e que contribuiu expressivamente para o meu crescimento pessoal e como pesquisadora.

Gostaria de agradecer aos professores Antônio Eduardo, Sérgio, Faria, Carlos, Evandro e todos os outros que contribuíram com idéias e disponibilizaram seus laboratórios para análises importantes, apresentadas neste trabalho. Gostaria de agradecer ao apoio concedido pela Izabel, secretária do Instituto de Química.

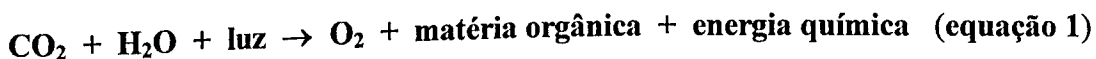
Expresso também minha enorme gratidão aos meus amigos e colegas de curso Cléia, Maria Izabel, Maria Luiza, Eduardo e Jackson pois sem suas contribuições, não seria possível a execução deste trabalho.

## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

A fotossíntese é o processo pelo qual a energia do sol é captada e convertida em energia química e constitui a rota pela qual praticamente toda a energia entra na biosfera. A cada ano mais de 100 bilhões de toneladas métricas de açúcares, são produzidos pelos organismos fotossintetizantes, em escala mundial. A importância da fotossíntese, entretanto, estende-se além do peso absoluto deste produto. Sem este fluxo de energia solar, canalizado principalmente através dos cloroplastos das células eucarióticas, o ritmo da vida no planeta iria diminuir rapidamente e, então, seguindo a inexorável segunda lei da termodinâmica, cessaria quase que completamente.<sup>[1]</sup>

O desenvolvimento dos conceitos científicos que contribuíram para o conhecimento do mecanismo da fotossíntese, teve seu início no final do século XVIII, com a descrição do “fenômeno do melhoramento do ar realizado pelas plantas”, por K. Priestley, em 1776. Considerando a formulação geral da fotossíntese que se conhece hoje, temos:



Da análise da equação fundamental da fotossíntese, representada pela equação 1, concluímos que: a) a reação entre o gás carbônico e a água, produzindo carboidratos e oxigênio, dá-se exclusivamente em presença de luz e, é confinada aos cloroplastos; b) a síntese de carboidratos implica na disponibilidade de uma quantidade de energia química, que pode ser utilizada pela célula em vários processos metabólicos.

Os cloroplastos são partículas subcelulares, genericamente denominadas organelas, que ocorrem nos tecidos verdes, em maior número nas células do mesófilo das folhas (figura 1). O envelope, ou membrana externa, possui características de membrana unitária dupla e limita a matriz fluída, o estroma, e um conjunto complexo de estruturas membranosas. Existem conjuntos de membranas, em forma de discos achatados e dispostos uns sobre os outros, denominados grana, que são interligados por um sistema de lamelas duplas, que se dobram sobre si mesmas e formam canais ou vesículas alongadas.<sup>[2]</sup> Cada granum é composto de um número variável de discos membranosos, chamados de tilacóides, os quais são dispostos em pilhas, deixando um pequeno espaço entre si (figura 2).

.....  
**Figura 1** - Representação de um cloroplasto de célula de mesófilo com seus principais componentes.

.....  
**Figura 2** - Esquema de um granum mostrando os sistemas de membranas, representadas pelos tilacóides.

O sistema de membranas, representado pelos grana e pelas lamelas, é a sede das reações fotoquímicas responsáveis pela captação e transformação da energia luminosa em energia química. Estas membranas contêm os pigmentos e demais componentes envolvidos na captura da luz, os quais são dispostos de maneira otimizada a fim de proporcionar máxima eficiência para a absorção de energia radiante. A matriz ou estroma é o local de ocorrência das

reações envolvidas na fixação do gás carbônico e a conseqüente produção de carboidratos, além de outros derivados, tais como: aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos.

Dentre os componentes específicos dos cloroplastos, os mais importantes são representados pelos pigmentos, principalmente as clorofilas (verdes) e outros pigmentos, os carotenóides ( amarelo ou alaranjado) que são chamados de pigmentos acessórios.

A estrutura das clorofilas a e b é basicamente a mesma, apresentando uma porção porfirina, constituída de quatro anéis de pirrol ligados por pontes de carbono-hidrogênio. O íon metálico, magnésio, se insere no centro da porfirina. Outra característica da molécula de clorofila é a cadeia carbônica denominada fitol, que é ligada ao sistema de anéis pirrólicos (figura 3).

.....  
**Figura 3.** Estrutura química da clorofila.  
.....

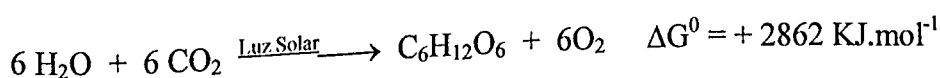
.....  
**Figura 4.** Espectro de absorção das clorofilas a e b.  
.....

A análise do espectro de luz da clorofila (figura 4) mostra picos distintos nas regiões do azul-violeta (430-453 nm) e do vermelho (643-660 nm), comprimentos de onda que são abundantes na radiação solar. Cada molécula de clorofila ocupa uma área de aproximadamente 200 angstroms, da membrana do tilacóide, a qual fica coberta com uma camada homogênea de anéis porfirina. Um tilacóide de cloroplastos de espinafre contém aproximadamente  $10^5$  moléculas de clorofilas<sup>[2]</sup>. Experimentos conduzidos por Emerson e Arnold em 1932, sugeriram que a absorção da luz nos cloroplastos se faz através da cooperação de várias moléculas de clorofila, que resulta em um aumento da eficiência da fotossíntese. Eles determinaram a quantidade de oxigênio liberado por uma cultura de algas *Chlorella* em função do aumento da energia radiante incidente, feita através de lampejos de curta duração (flashes). Os resultados indicaram que a cooperação de um mínimo de 2500 moléculas de clorofila, eram necessárias para que ocorresse a liberação de uma molécula de oxigênio<sup>[2]</sup>.

Experimentos subseqüentes conduzidos por Duysens e colaboradores mostraram que o processo de absorção e transferência de energia radiante é realizado por dois sistemas de pigmentos, aos quais foram chamados de fotossistemas I e II. Ambos são constituídos por moléculas clorofila a e b em diferentes proporções, sendo que o fotossistema I contém mais clorofila a do que clorofila b, quando comparado com o fotossistema II.

.....  
**Figura 5** – Distribuição das clorofilas nos fotossistemas I e II.  
.....

Quando a energia luminosa incide sobre os sistemas de pigmentos localizados nas membranas dos cloroplastos, ocorre a excitação das moléculas através do deslocamento dos elétrons para níveis energéticos mais elevados. Na reação da fotossíntese, a energia absorvida pelos pigmentos é transferida para outros compostos, através do transporte eletrônico. Desta maneira, é possível definir a fotossíntese como uma reação de óxido-redução onde participam o CO<sub>2</sub> como oxidante e a H<sub>2</sub>O como o redutor, e que envolve a transferência de quatro elétrons através de um gradiente de potencial de cerca de 1,2 volt<sup>[3]</sup>.



Considerando a participação dos fotossistemas I e II no processo de absorção e transferência de energia para as reações fotoquímicas, Hill e Bendall propuseram um esquema para o transporte eletrônico na fotossíntese baseado nos potenciais de óxido-redução; sua

espécies adjacentes ou, indiretamente, quando alteradas quimicamente durante o processo de decomposição, dando origem a produtos secundários que podem ser efetivos.

2) Quando há liberação de substâncias voláteis, que podem afetar o crescimento de outras plantas.

3) Quando são exudadas diretamente das raízes, influenciando direta ou indiretamente, na ação de microorganismos e nas interações entre as plantas.

4) Quando compostos orgânicos e inorgânicos são lixiviados pela ação da chuva ou orvalho<sup>[9]</sup>.

A forma como as substâncias alelopáticas atuam nas plantas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores, mas o processo ainda se encontra pouco esclarecido. As funções que afetam o mecanismo de atuação são muito similares às dos herbicidas. Tal como nestes, a dificuldade de se entender o processo está no fato de que, na maior parte dos casos, afetam mais de uma função e provocam efeitos colaterais difíceis de serem separados dos principais<sup>[6]</sup>.

Os mecanismos de ação dos aleloquímicos estão relacionados com processos fisiológicos na planta, como a inibição da germinação e do crescimento, pois interferem na divisão celular; alteração da permeabilidade de membranas; alteração na ativação de enzimas, assimilação de nutrientes, crescimento, fotossíntese e na produção de hormônios pela planta. Alguns aleloquímicos como os ácidos fenólicos chegam a inibir a absorção de fósforo e potássio<sup>[9]</sup>. A grande dificuldade no conhecimento sobre a atividade dos aleloquímicos é uma explicação para a diferença na sensibilidade das espécies para os compostos. Uma grande quantidade de sementes ou biomassa de plântulas pode explicar como espécies são mais tolerantes do que outras com poucas sementes ou biomassa, embora o mecanismo fisiológico, o qual poderia explicar as diferenças na sensibilidade, raramente tenha sido investigado<sup>[10]</sup>.

A presença de aleloquímicos nos seres vivos constitui uma forma de comunicação, pois permite a eles a distinção entre os que lhes são prejudiciais e os benéficos ou indiferentes. Nas comunidades de seres vivos ocorre entre os vários elementos uma constante guerra química, a qual, em última análise, define constituição específica e quantitativa dessas comunidades. Atualmente são conhecidos cerca de dez mil produtos secundários com ação alelopática, o que é considerado apenas uma pequena parte da quantidade virtualmente existente na natureza. Os compostos já identificados pertencem a diversos grupos químicos, atribuindo-se maior importância aos terpenóides, esteróides, alcalóides, cianoidrinas, ácidos graxos, poliacetilenos, lactonas, taninos, derivados do ácido benzóico e do ácido ciânico, fenóis, cumarinas e flavonóides. Os efeitos alelopáticos raramente são provocados por uma única substância, sendo comum que o efeito se deva a um conjunto de substâncias, relacionados ainda com as condições ambientais como umidade, temperatura e outros<sup>[11]</sup>.

Identificar aleloquímicos, em diversas culturas, auxilia os especialistas em melhoramento genético na criação de genótipos mais resistentes a bactérias, fungos e insetos. Os aleloquímicos responsáveis pela proteção contra bactérias e fungos localizam-se principalmente na epiderme dos órgãos<sup>[11]</sup>.

## 1) INTRODUÇÃO:

A agricultura moderna mundial exige cada vez mais o uso de herbicidas, no controle de plantas daninhas. No entanto, fatores econômicos e ambientais fazem com que estes produtos sejam rapidamente modificados pois com o manejo, seus componentes passam a ser ineficientes, pelo fenômeno da resistência das plantas daninhas aos componentes ativos dos diversos herbicidas comerciais. As fitotoxinas naturais constituem uma reserva enorme de componentes com alto potencial agrícola, muitos deles possuem sítios ativos que não foram ainda estudados e que podem ser explorados como herbicidas sintéticos.<sup>(8)(7)</sup>

O estudo da interação química entre as plantas, pode ter outras aplicações, como no desenvolvimento de uma nova classe de herbicidas naturais mais suaves<sup>(7)</sup>. Compostos alelopáticos são de fato fontes potenciais de fitotoxinas que lideram os novos quimiotipos de herbicidas. Surpreendentemente, seu potencial continua pouco, relativamente inexplorado comparado com os compostos microbiológicos<sup>(12)</sup>.

O extrato das raízes do Algodãozinho (*Cochlospermum regium*) é rico em taninos<sup>(9)</sup>, saponins<sup>(10)</sup> e flavonóides<sup>(11)</sup>, testes de toxicidade subaguda revelaram que o extrato do Algodãozinho (*Cochlospermum regium*) é bem tolerado em ensaios feitos com animais.

Neste trabalho investigaremos o efeito fitotóxico alelopático dos extratos do caule e folhas do Algodãozinho (*Cochlospermum regium*) sobre os cloroplastos, síntese de ATP, fluorescência das clorofilas e germinação de sementes.

## 2) MATERIAIS E MÉTODOS:

### 2.1) Preparação dos extratos das folhas e do caule do *Cochlospermum regium* (Algodãozinho):

Os extratos metanólicos foram preparados à partir de folhas e caule, secos e triturados do *Cochlospermum regium* (Algodãozinho), coletado na região de Uberlândia, em janeiro de 2002. Foram pesados 117g de caule e adicionados a 600mL de metanol e 60g de folhas em 200mL de metanol; estas misturas ficaram em repouso, ao abrigo da luz e calor por 30 dias. Os resíduos sólidos ou extratos do caule e das folhas do *Cochlospermum regium*, foram obtidos após a evaporação do metanol à temperatura de 35°C, utilizando rotaevaporador (.....). As soluções estoque de extrato, foram preparadas à partir de 0,5 mg de extrato (caule e folhas), solubilizado em 3gotas de etanol e o volume foi completado com água até 5mL de solução; estas soluções foram usadas nos ensaios de investigação do potencial herbicida dos extratos de folhas e caule do *Cochlospermum regium*.

### 2.2) Isolamento dos cloroplastos:

Os cloroplastos foram extraídos de folhas frescas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) cultivadas por Odécio & Filhos®. As folhas de espinafre frescas, foram lavadas em água corrente e secas, em papel toalha, em seguida, foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. As folhas cortadas foram adicionadas ao copo de liquidificador previamente resfriado, juntamente com 200mL de meio contendo 400mM de glicose, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de KCl, 3mM de MnCl<sub>2</sub>, 1mM de EDTA e Hepes a 1%, o pH foi ajustado em 8,0 com NaOH<sup>[12] [13]</sup>. Com a função pulsar do liquidificador, foram dados em média, 5 pulsos pausadamente, para isolar uma quantidade máxima de cloroplastos intactos. Esta mistura foi filtrada em 4 camadas de tecido poroso (fraldas de criança). O filtrado foi centrifugado em, centrífuga refrigerada (.....) a 4°C, durante 10 minutos a velocidade de 600xg. O sobrenadante é extraído e novamente centrifugado por 10 minutos a 4°C e 3500xg.

Neste estágio o sobrenadante é descartado e o pellet formado, contendo os cloroplastos é ressuspensão em 3 mL de meio. Esta mistura deve ficar em repouso por 1 hora no escuro a 4°C.

### 2.3) Quantificação das Clorofilas:

A quantificação das clorofilas é feita utilizando método espectroscópico<sup>[14]</sup>, onde 50 µL de solução contendo cloroplastos, são adicionados em balão volumétrico de 5 mL e o volume é completo com acetona 80%; esta mistura é homogeneizada e as leituras de absorbância são feitas utilizando espectrofotômetro (.....) em 665nm e 649nm. Os resultados de absorbância obtidos, foram substituídos na equação abaixo e a quantidade de clorofilas pode ser calculada.

$$(A_{665} \cdot 6,45 + A_{649} \cdot 17,72) \cdot 5 = x \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}^{[14]}$$

### 2.4) Espectroscopia de UV:

Em uma cubeta de 1 mL foram adicionados 20 µg de clorofilas, solução contendo o extrato das folhas e do caule do *Cochlospermum regium* em concentrações crescente (de 1µg/ml a 20µg/mL) o volume da cubeta foi completo com um meio contendo: 400mM de glicose, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de KCl, 3mM de MnCl<sub>2</sub>, 1mM de EDTA e HEPES 1%, em pH 8,0 ajustado com solução de NaOH. A mistura reacional foi iluminada por um minuto, com luz de retroprojeto (GAF 2669) passando por um filtro de 5cm contendo solução de CuSO<sub>4</sub> 1%<sup>[13]</sup>. A leitura de absorbância foi feita à 665nm, antes e após a iluminação. Este teste foi feito, utilizando o mesmo procedimento descrito para os extratos das folhas e do caule do *Cochlospermum regium*, para o herbicida metil-viologen (MV) em concentrações crescente (de 0,64µg/mL a 2,56µg/mL) os resultados obtidos com o herbicida foram comparados com os resultados obtidos com os extratos. As concentrações de extrato e de MV correspondem a volumes iguais em µL adicionados.

### 2.5) Extração das membranas tilacóides:

As membranas tilacóides foram isoladas das folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). As folhas de espinafre frescas cultivadas por Odécio & Filhos®, foram primeiramente lavadas em água corrente e, posteriormente em água destilada; em seguida foram secas, com papel toalha e cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. As folhas cortadas foram adicionadas ao copo de liquidificador previamente resfriado, juntamente com 250mL de meio contendo 300mM de sorbitol, 50mM de tricina-Na, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM de ascorbato de sódio, 2mM de EDTA e 0,05% de albumina em pH 7,8 ajustado com solução de NaOH. Com a função pulsar do liquidificador, foram dados em média, 5 pulsos pausadamente para homogeneizar a mistura.

O homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de tecido poroso (fralda de criança) e centrifugado a 1100xg por 5 minutos à 4°C. O pellet formado foi ressuspensão em um meio contendo 25mM de tricina-Na e 10mM de MgCl<sub>2</sub> em pH 7,8 e 4°C. A mistura ficou em repouso no escuro por 30 minutos à 4°C, sendo em seguida centrifugada a 3000xg por 5 minutos. O pellet formado contendo as membranas tilacóides foi novamente ressuspensão em 5mL de meio contendo 100M de sorbitol, 25mM de tricina-Na, 10mM de MgCl<sub>2</sub> e 10mM de NaCl em pH 7,8<sup>[16]</sup>. As clorofilas foram quantificadas espectroscopicamente de acordo com o procedimento descrito no item 2.3 deste trabalho.

## 2.6) Síntese de ATP:

As membranas tilacóides isoladas e quantificadas (20µg/mL) foram misturadas e incubadas com o extrato das folhas e do caule do *Cochlospermum regium* em concentrações crescente (2,5µg a 20µg) em recipientes de 1mL durante 30 minutos, no escuro a temperatura de 4°C. Esta mistura foi adicionada a uma cubeta, contendo 5mL meio reacional composto de 100mM de sorbitol, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de KCl, 1mM de tricina-Na, 1mM de ADP e 3mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; foram adicionados neste meio 50µM de metil- viologen (MV), como acceptor de elétrons na reação de Hill <sup>[15][16][17]</sup>.

A síntese de ATP foi medida em pH variando de 8,1 a 8,0 usando pHmetro modelo (.....) e na temperatura de 30°C mantida constante através de banho termostático (.....).

## 2.7) Teste de Fluorescência:

As membranas tilacóides, isoladas das folhas de espinafre (*Spinacea oleracea*) foram quantificadas (200µg/mL), misturadas e incubadas com o extrato das folhas e do caule do *Cochlospermum regium* em concentrações crescente (5µg/mL a 20µg/mL) em recipientes de 1mL durante 30 minutos, no escuro a temperatura de 4°C. Esta mistura foi adicionada a uma cubeta e a leitura de fluorescência (fluorímetro modelo F-4500 Hitachi, F<sub>1</sub>=F<sub>2</sub>=5nm) foi realizada num intervalo de 400nm a 700nm <sup>[18][19]</sup>.

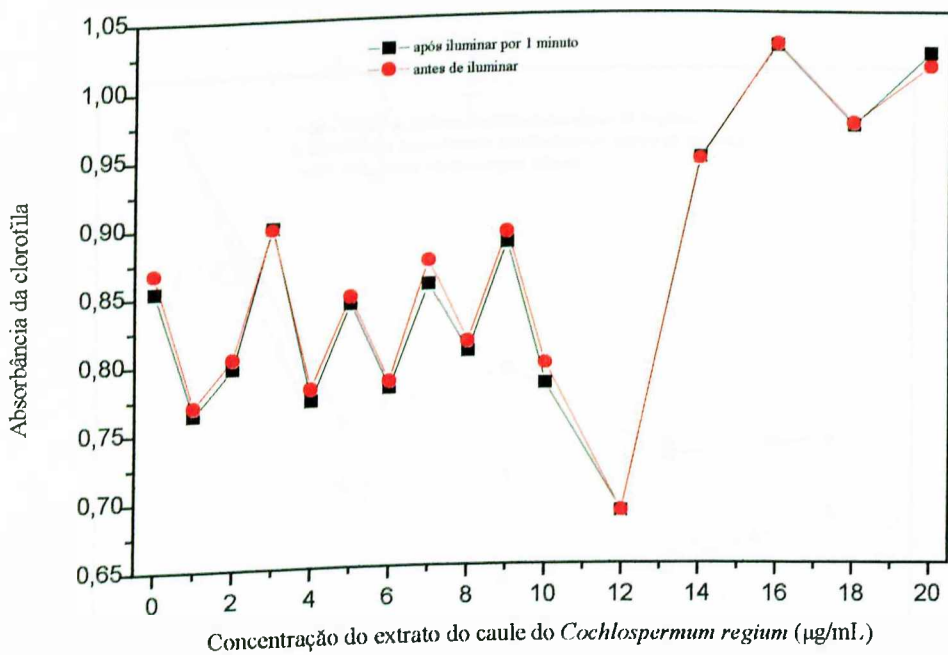
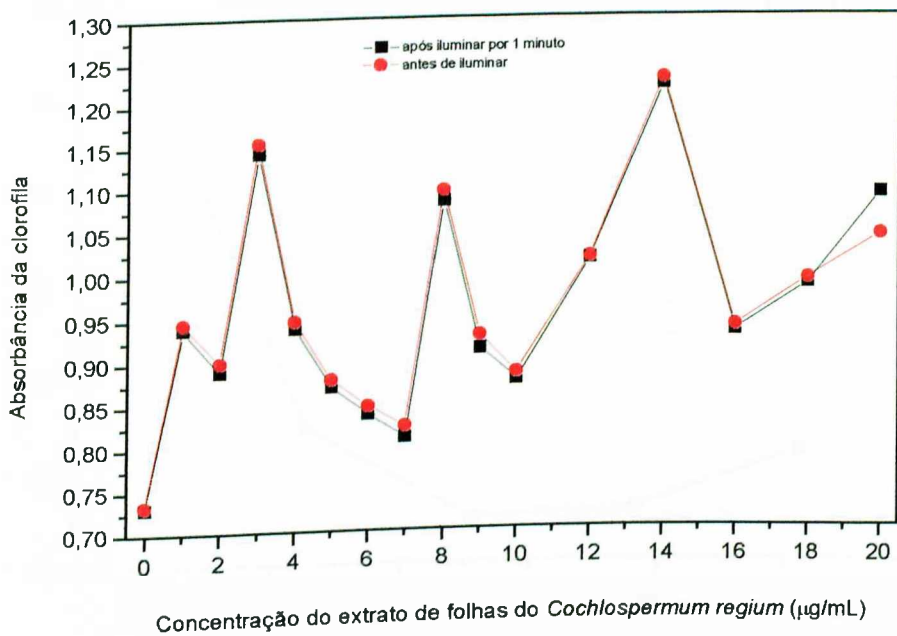
## 2.8) Evolução de Oxigênio:

As membranas tilacóides isoladas e quantificadas (20µg/mL) foram misturadas e incubadas com o extrato das folhas e do caule do *Cochlospermum regium* em concentrações crescente (2,5µg a 20µg) em recipientes de 1mL durante 30 minutos, no escuro a temperatura de 4°C. Esta mistura foi adicionada a uma cela preparada para este ensaio, conectado a um microeletrodo para medidas de oxigênio, contendo 2mL meio reacional composto de 800mM de sacarose, 50mM de MOPS-NaOH, 15mM de CaCl<sub>2</sub>, 1mM de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 300µM de DBMIB. O pH do meio foi ajustado com hidróxido de sódio até o valor de 6,2, em banho termostaticado a 30 °C. A mistura reacional foi iluminada por um minuto, com luz de retroprojektor (GAF 2669) passando por um filtro de 5cm contendo solução de CuSO<sub>4</sub> 1% <sup>[13]</sup>.

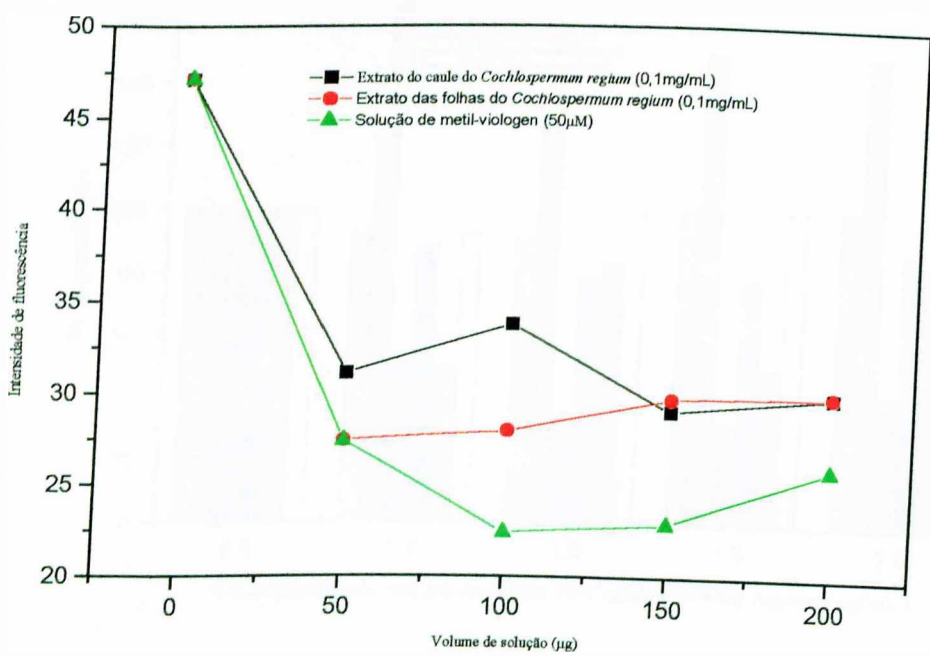
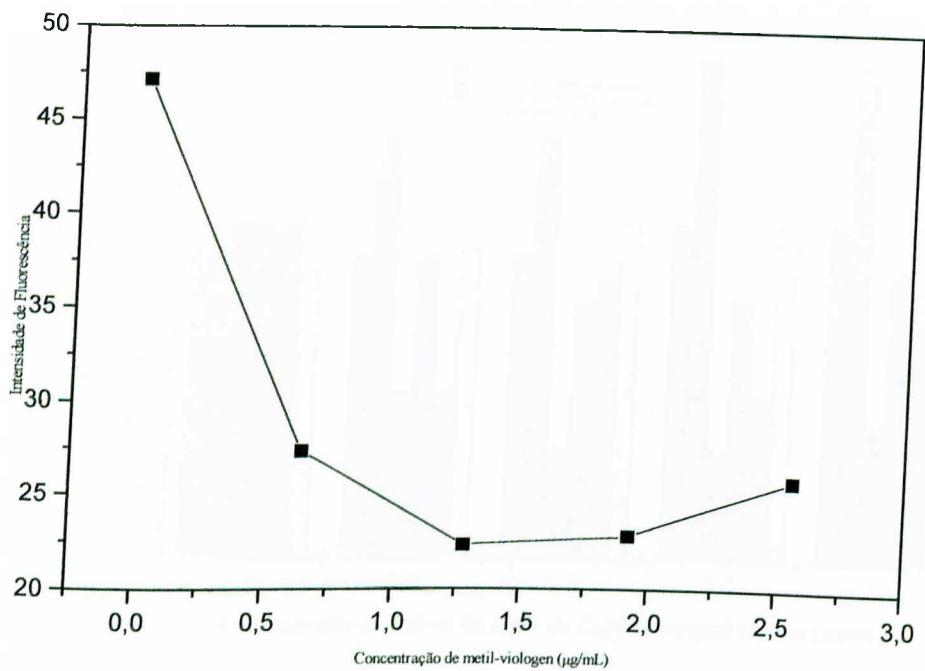
## 2.9) Testes de germinação:

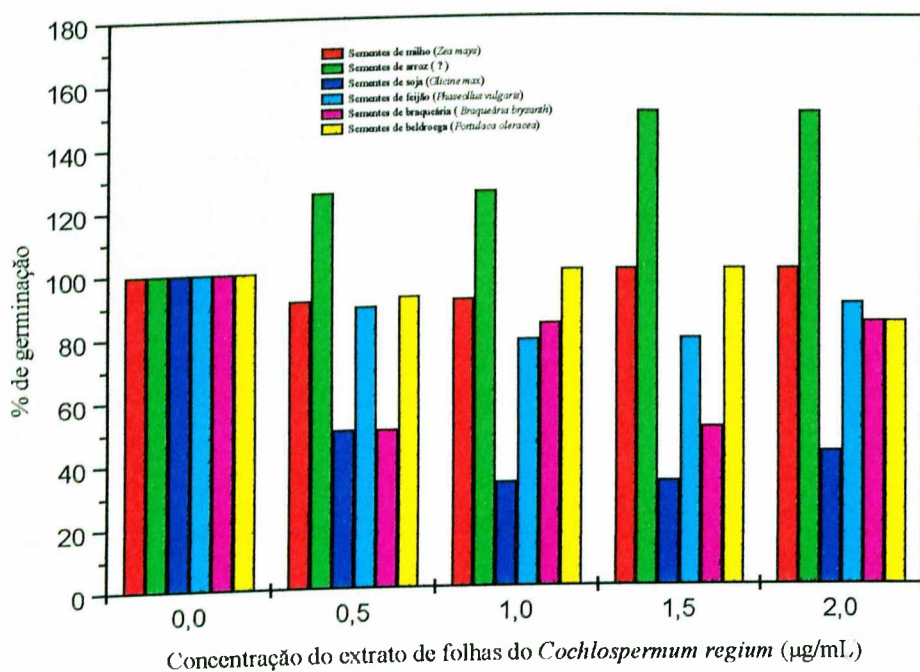
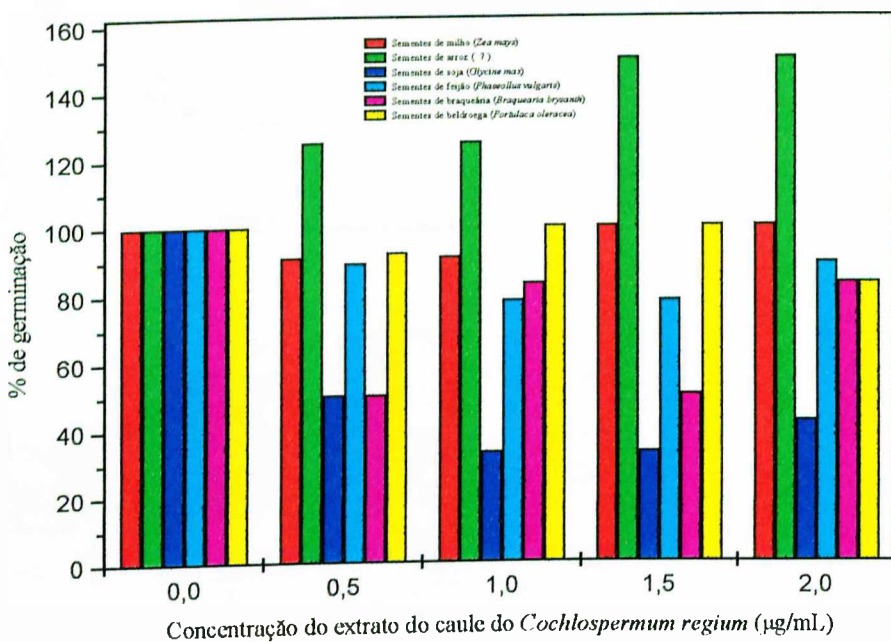
No ensaio de germinação foram usadas sementes de Braqueária ( Braquearia bryzanth-Plant Verd ), milho (Zea mays- Primaiz), feijão ( Phaseollus vulgaris- Variedade Pérola), soja (Glycine Max- variedade Cultivar Liderança ) e beldroega (Portulaca oleracea- Topseed Sementes Ltda). As sementes foram selecionadas e lavadas em solução de NaClO à 10%. O ensaio de germinação foi executado em placas de Petri com 9cm de diâmetro, contendo papel de filtro, 10mL de água deionizada e diversas concentrações de extrato. Em cada placa foram colocadas 25 sementes de braqueária e 25 de bedroega ; para as outras sementes o ensaio foi com 10 sementes, todos em triplicata. As sementes ficaram em germinadora esterelizada por 5 dias, no escuro e à 25°C.

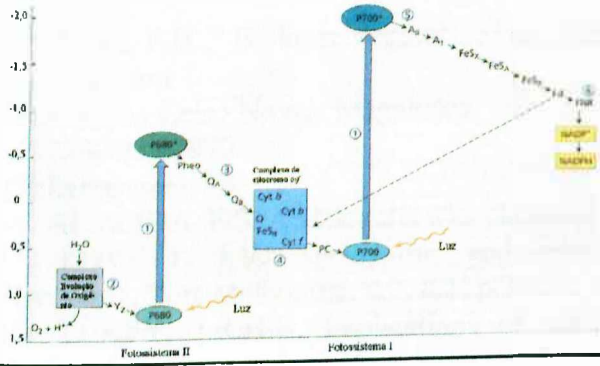
Neste trabalho estão representados as porcentagens de germinação na forma de gráficos e tabelas, onde o zero representa o controle <sup>(6)</sup>.



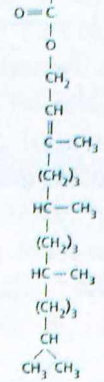
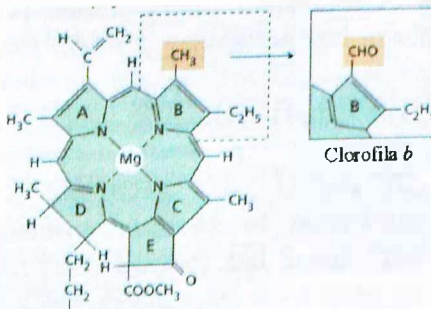
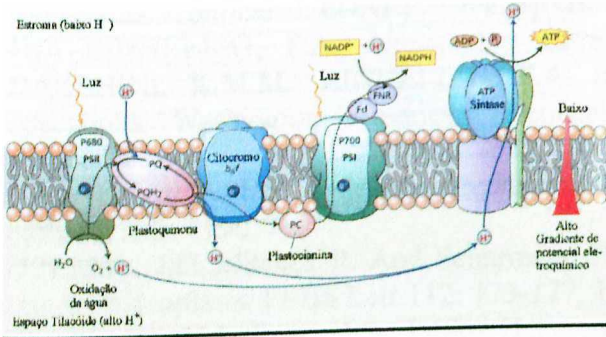








Estroma (baixo H<sup>+</sup>)



Clorofila a

## **BIBLIOGRAFIA:**

- [1] Raven, P.H., "Biologia Vegetal", 5ª ed., Editora Guanabara Koogan S.A., RJ, 1996.
- [2] Robertson
- [3] Antônio Celso Novais Magalhães
- [4] Kok et al 1970
- [5] Lehninger
- [6] ALMEIDA, F.S. A alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (Circular,53).
- [7] LOVETT, J.V. Allelopathic and self-defence in plants. Australian Weed Control Handbook, Port Melbourne, v.2, n.1, p.33-36, 1982.
- [8] TUKEY, J.R.H.B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. Botany Review. Lancaster, v.1, n. 35, p. 1-16, 1969.
- [9] RODRIGUES, L.R. de A.; RODRIGUES, T. de J.D.; REIS, R.ª Alelopatia em plantas forrageiras. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 8p.(Boletim).
- [10] EINHELLIG, F.A. Allelopathy: current status and future goals In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; EINHELLIG, F.A. (eds.). Allelopathy: organisms processes, and applications. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 1-24. (ACS Symposium Series, 582).
- [11] ALMEIDA, F.S. A defesa das plantas: Alelopatia. Ciência Hoje, São Paulo, v.1, n.62, p.40-46, mar. 1990.
- [12] Mills, J.D., Mitchel, P. And Schurman, P., Modulation of Coupling ATPase Activity in Intact Chloroplasts. FEBS Lett 112: 173-177, 1980.
- [13] Macias, M.L., Rojas, I.S., Lotina-Hennsen, B., Effect of Selected Coumarins on Spinach Chloroplasts Photosynthesis, J. Agric. Food Chem. 47: 2137-2140, 1999.
- [14] Strain, H.H., Coppe, B.T. and Succ, W.A., Analytical Procedures for the Isolation, Identification, estimation and investigation of the Chlorophylls, Meth. Enzymol. 23: 452-466, 1971.
- [15] Dilley, R.A., Ion Transport  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  Exchange Phenomena, Meth. Enzymol 24, 68-74, 1971.
- [16] Céspedes, C.L., Uchoa, A., Salazar, J.R., Perich, F. And Pardo, F. Plant Growth Inhibitory Activity of *p*-Hydroxyacetophenones and Tremetones from Chilean Endemic *Baccharis* Species and Some Analogous: A Comparative Study, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 2283-2292.
- [17] Calera, M.R., Mata, R., Anaya, A.L. and Hennsen, B.L., 5-O-*B*-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts, Photosynthesis research 45: 105-110, 1995.
- [18] Rimando, A.M., Dayan, F.E., Czarnota, M.A., Weston, L.A and Duke, S.O., A New Photosystem II Electron Transfer Inhibitor from *Sorghum bicolor*, J. Nat. Prod. 1998, 61: 927-930.
- [19] Habash, D., Percival, M.P. and Baker, N.R., Rapid chlorophyll fluorescence technique for the study of penetration of photosynthetically active herbicides into leaf tissue, Weed Research, 1985, 25: 389-395.