



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Sylmara de Melo Luz

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS QUÍMICAS COM
PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS EM
Acacia mangium (Willd.)**

**Belém
2009**

Sylmara de Melo Luz

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS QUÍMICAS COM
PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS EM
Acacia mangium (Willd.)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pedro da Silva Sousa Filho.

**Belém
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

Luz, Sylmara de Melo

Prospecção de moléculas químicas com propriedades alelopáticas em *Acácia mangium* (Wild.) / Sylmara de Melo Luz; orientador Antônio Pedro da Silva Sousa Filho - 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2008.

1. Alelopatia. 2. Acacia. 3. Química vegetal. 4. Leguminosas. 5. Plantas daninhas. 6. Pragas agrícolas – Controle biológico I. Título.

CDD – 22.ed. 632.96

Sylmara de Melo Luz

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS QUÍMICAS COM
PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS EM
Acacia mangium (Willd.)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pedro da Silva Sousa Filho.

Data da aprovação. Belém - PA: 02/03/2009

Banca Examinadora

Dr. Antonio Pedro da Silva Souza Filho
Embrapa Amazônia Oriental

Dr. Francisco Affonso Ferreira
Universidade Federal de Viçosa

Dr^a. Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon
Universidade Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

Em ordem cronológica dos acontecimentos, agradeço a Deus, Soberano e Rei, que me formou e porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus queridos pais Aloísio e Cleia Luz, que se alegram com cada vitória minha, como se fosse deles mesmos. Eu os amo!

Aos meus irmãos Jefferson, Marcos, Claudia e Soraya que sempre me alegram e me ajudam nas horas aperreadas.

Ao meu amigo zootecnista Élcio, que me deu o incentivo certo pra fazer a prova de admissão do Mestrado de Ciência Animal.

À amiga agrônoma e M. SC. Alessandra Rodrigues, que me deu as dicas de como estudar pras provas de admissão e também me apresentou ao professor Dr. José Brito de Lourenço Jr., que tão gentilmente me acolheu como sua orientada “interina”, ainda como aluna especial, me direcionando em seguida ao meu atual orientador. Obrigada, professor!

Ao então pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Dr. Ari Pinheiro Camarão, que prontamente me concedeu uma carta de aceite como possível orientador, para protocolar os processos de seleção no curso.

À amiga zootecnista Minelli Matos Xavier, e agora colega de mestrado, que me deu valiosas dicas sobre possíveis pontos a serem abordados no dia da prova dissertativa de seleção.

Ao meu querido orientador, professor Dr. Antônio Pedro da Silva Souza Filho, que me aceitou de pronto e me concedeu a oportunidade de desenvolver um pensamento mais amadurecido sobre os estudos e a pesquisa, tendo muita paciência, do começo ao fim, e acreditando que “desse mato pudesse sair algum coelho” (tomara que saia). Sou-lhe muito grata, professor!

À Embrapa Amazônia Oriental, pela infraestrutura oferecida no Laboratório de Agroindústria.

Aos laboratoristas Gilberto, Ana e Solange que sempre me socorriam no Laboratório de Agroindústria.

A todos os professores do curso de Ciência Animal.

Aos meus colegas de curso, em particular os da fase de aluna especial: Onel Solano (Cubano), as “Rafaelas”, Sandra de Souza, Alessandra Rodrigues, Elizabeth Barbosa, Leo (Baiano), Raimundo Júnior, Greice, enfim, toda a turma que viajou com o professor Ribamar Marques (obrigada, professor) pra Ilha do Marajó estudar produção de bubalinos. Valeu, professor. Valeu, galera!

À querida amiga de começo de curso Eneida P. Mota Dantas.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos “nikeiros” (Maria, Pati, Adriana, Darci, Larissa, Claudia, Lucas, Jajá, Helder, Edu Dantas, André, Judson, Mônaco, Breno, Edu Faleiros e o capitão Ivo) que me ensinaram a ser mais perseverante e a saber que eu posso andar em segurança mesmo quando não enxergo nada a minha frente, porque Deus segura minha mão.

Ao amigo químico Robson Ferreira, que foi o instrutor nos trabalhos de cromatografia.

À querida Izabella Rodrigues de Viçosa-MG, que muito me ajudou em momentos cruciais do experimento.

Aos professores que participaram da banca do exame de qualificação: Dra. Mara Arruda, Dr. Almir Silva, Dr. Ari Camarão e Dr. Antônio Pedro Souza Filho.

À professora Dra. Giselle Guilhon do laboratório de química da UFPA, pela paciência e disposição em explicar as análises de RMN.

À química M. Sc. Karime do Socorro de Souza Vilhena, que sempre me salvava nas questões nebulosas (para mim) da Química Orgânica.

À química M. Sc. Lívia Lobo, que foi muito solícita ao fazer o contato para as análises de HPLC.

Ao Dr. Milton Nascimento da Silva pela disposição em contribuir com as análises de HPLC no Laboratório de Cromatografia Líquida (Labcrol) da UFPA.

Ao químico Manolo Cleiton Costa de Freitas, que se prontificou a ajudar em todos os processos das análises de cromatografia líquida, desde a parte metodológica até a discussão dos resultados.

Ao pesquisador Dr. Roberto Cunha, por nos ajudar com as análises estatísticas.

À coordenadora do Curso Prof^a. Dr^a. Sheyla Farhayldes Souza Domingues, ao secretário do curso Rodrigo e ao Jônisson, do protocolo.

Ao CNPq/PPG7, que financiou o projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Obrigada a todos. Deus os abençoe!

RESUMO

Muito se tem estudado sobre o potencial que algumas plantas têm de inibir o desenvolvimento de outras plantas. Em busca de alternativas para reduzir a dependência de herbicidas sintéticos, diminuindo os danos ambientais e prejuízos à saúde humana e procurando alternativas à resistência aos herbicidas do mercado, os compostos naturais oferecem excelentes perspectivas. Este trabalho isola, identifica as estruturas e caracteriza a atividade alelopática de duas substâncias químicas produzidas pela espécie *Acacia mangium*. Para isso, procede-se com solução hidroalcoólica (7:3) extração exaustiva das folhas secas caídas, folhas verdes, raízes e sementes dessa espécie, passando-se pela recuperação do etanol (evaporador rotativo) e liofilização dos extratos para a desidratação e obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA). Para identificar qual parte da planta possui maior potencial alelopático, é preparado um bioensaio com a utilização de solução hidroalcoólica (7:1) de cada EBHA em concentração de 1%. É determinado o potencial inibitório sobre a germinação, desenvolvimento do hipocótilo e desenvolvimento da radícula das sementes das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*), mata-pasto (*Senna alata*) e puerária (*Pueraria phaseoloides*). 10 g do EBHA das folhas caídas são submetidas à CCVU para separação das substâncias, a partir do qual são obtidas quatro reuniões de substâncias semelhantes. Três delas são refracionadas em colunas menores (R1', R2-R3', R4') e da coluna R1' são isoladas as substâncias Lupenona e Lupeol. Nos bioensaios com os extratos, o das folhas secas apresenta as inibições mais acentuadas, notadamente sobre a germinação (99%). Nesta característica, mata-pasto é a espécie de menor sensibilidade, com inibições abaixo de 12%. São realizados bioensaios com as substâncias isoladas e em par (solubilizadas em clorofórmio), na concentração de 140 ppm, sobre as sementes de *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*. Para a germinação das sementes, as substâncias em todos os tratamentos não evidenciam qualquer efeito. Para o desenvolvimento da radícula, ambas as substâncias, isoladamente, promovem inibições em torno de 40% sobre duas espécies de plantas daninhas, enquanto que em par, observa-se que há antagonismo entre as substâncias, já que os resultados são inferiores, ficando ao redor de 30%. Com relação ao

crescimento do hipocótilo a inibição em todos os tratamentos fica em torno de 15% e não há diferença significativa entre os resultados. É testado também o efeito do pH (3,0 e 9,0) na atividade alelopática das substâncias, isoladas e em par, sobre a germinação das sementes de malícia e observa-se que há interação para os fatores pH e germinação, havendo maior atividade inibitória da lupenona em condições ácidas e do lupeol em condições alcalinas. Não há efeito aditivo ou negativo quando da associação das substâncias. É realizada também análise por HPLC nos extratos brutos hidroalcoólicos de três partes da planta *Acacia mangium* para a detecção dos flavonóides catequina e epicatequina (substâncias com comprovado efeito alelopático), sendo que a epicatequina é a substância com absorção para os espectros selecionados, mostrando que esta substância pode ter contribuído para os resultados expressivos observados nos primeiros bioensaios com os extratos brutos das partes das plantas.

Palavras-chave: alelopatia, Leguminosae, catequinas, lupenona, lupeol.

ABSTRACT

Much has been studied on the potential that some plants have to inhibit the development of other plants. In search of alternatives to reduce dependence on synthetic herbicides, reducing environmental damage and harm to human health and seeking alternatives to herbicide resistance to the market, the natural compounds offer excellent prospects. This study isolates, identify the structures and features the allelopathic activity of two chemicals produced by the species *Acacia mangium*. For this, it is with water-alcohol solution (7:3) exhaustive extraction of fallen leaves, green leaves, roots and seeds of this species, passing by the recovery of ethanol (rotary evaporator) and lyophilization of the extracts for dehydration and obtaining the hydroalcoholic crude extract (HCE). To identify which part of the plant has higher allelopathic potential, a bioassay is prepared with the use of water-alcohol solution (7:1) of each HCE concentration of 1%. We determined the inhibitory potential on the germination, development of hypocotyl and radicle of the weed seeds *Mimosa pudica*, *Senna alata* e *Pueraria phaseoloides*. 10 g of HCE of fallen leaves are subjected to CCVU for separation of substances, from which are obtained four meetings similar substances. Three of them are lower refractive in columns (R1', R2, R3', R4') and column R1' are isolated substances lupenona and lupeol. In bioassays with extracts, the dried leaves shows the most pronounced inhibitions, especially on the germination (99%). In this feature, is the *Senna alata* species of lesser sensitivity, with losses below 12%. Bioassays are performed with the substances isolated and par (solution in chloroform), the concentration of 140 ppm on the seeds of *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*. For seed germination, the substances in all treatments did not show any effect. For the development of the radicle, the two substances alone, promote inhibition of around 40% on two species of weeds, while in addition, it appears that there is antagonism between the substances, since the results are below, with the around 30%. With respect aocrescimento of hypocotyl inhibition in all treatments is around 15% and no significant difference between the results. We also tested the effect of pH (3.0 and 9.0) in the allelopathic activity of the substances, alone and in pairs, on the germination of seeds of malice and observes that there is interaction for the factors pH and germination, with greater inhibitory activity of

lupenona under acidic and alkaline conditions in lupeol. There is additive or negative effect when the combination of substances. It is also performed by HPLC analysis on crude extracts water from three parts of the plant *Acacia mangium* for the detection of the flavonoids catechin and epicatechin (substances with proven allelopathic effect), with epicatechin is the substance with the absorption spectrum for selected, showing that substance may have contributed to the significant results observed in the first bioassays with crude extracts of plant parts.

Keywords: allelopathy, Leguminosae, catechins, lupenon, lupeol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1- Rotas prováveis de síntese de alguns grupos de aleloquímicos.	26
Figura 2- Sorgoleone	29
Figura 3- Grabdinol	29
Figura 4- Leptospermone	29
Figura 5- Vias prováveis seguidas por compostos aleloquímicos da liberação pela planta doadora até causar o efeito alelopático na espécie receptora.	32
Figura 6- Triterpenos pentacíclicos isolados de espécies do gênero <i>Acacia</i> .	43
Figura 7- Fórmulas estruturais da catequina e da epicatequina.	45
Fluxograma 1- Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA) das folhas caídas, folhas verdes, raízes e sementes de <i>Acacia mangium</i> .	48
Figura 8- Germinação de sementes de <i>Mimosa pudica</i> (testemunha à esquerda e tratamento com extrato das raízes de <i>Acacia mangium</i> à direita).	50
Figura 9- Coluna cromatográfica por via úmida com EBHA das folhas secas.	53
Fluxograma 2- Fracionamento e refracionamentos do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) das folhas caídas de <i>Acacia mangium</i> .	56
Figura 10- Estrutura química das substâncias Lupenona e Lupeol.	64
Figura 11- Espectro de RMN ¹ H da substância Lupenona (CDCl ₃ , 300 MHz).	65
Figura 12- Espectro de RMN ¹³ C da lupenona (CDCl ₃ , 75 MHz).	66
Figura 13- Expansão do espectro de RMN ¹³ C da Lupenona (CDCl ₃ , 75 MHz).	66
Figura 14- Espectro de DEPT da Lupenona (CDCl ₃ , 300 MHz).	67
Figura 15- Expansão do espectro de DEPT da Lupenona (CDCl ₃ , 300 MHz).	67
Figura 16- Espectro de RMN ¹ H da substância Lupeol (CDCl ₃ , 300 MHz).	68
Figura 17- Espectro de RMN ¹³ C do lupeol (CDCl ₃ , 75 MHz).	69
Figura 18- Expansão do espectro de RMN ¹³ C do lupeol (CDCl ₃ , 75 MHz).	
70	
Figura 19- Espectro de DEPT do Lupeol (CDCl ₃ , 300 MHz).	70
Figura 20- Expansão do espectro de DEPT do Lupeol (CDCl ₃ , 300 MHz).	71
Figura 21- Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas verdes.	76

Figura 22- Cromatograma do extrato hidroalcolico das raízes.	77
Figura 23- Cromatograma do extrato hidroalcolico das sementes.	77
Figura 24- Cromatograma dos padões de C1 e C2.	78
Figura 25- Expansão do cromatograma do pico de C1.	78
Figura 26- Expansão do cromatograma do pico de C2.	79
Figura 27- Espectro de ultravioleta do pico da substâncias C1 no $T_r = 31,17$ min.	79
Figura 28- Espectro de ultravioleta do pico da substâncias C2 no $T_r = 45,11$ min.	80
Figura 29- Expansão do cromatograma do extrato hidroalcolico Folhas Verdes.	81
Figura 30- Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,09$ min do extrato Folhas Verdes.	81
Figura 31- Expansão do cromatograma do extrato hidroalcolico de Raízes.	82
Figura 32- Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,03$ min do extrato de Raízes.	82
Figura 33- Expansão do cromatograma do extrato hidroalcolico das sementes.	83
Figura 34- Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,11$ min do extrato hidroalcolico das Sementes.	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de <i>Acacia mangium</i> sobre a germinação de sementes de plantas receptoras de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	61
Tabela 2 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de <i>Acacia mangium</i> sobre desenvolvimento da radícula de plantas receptoras de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	62
Tabela 3 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de <i>Acacia mangium</i> sobre desenvolvimento do hipocótilo de plantas de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	62
Tabela 4 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C para Lupenona e lupeol comparados com dados da literatura.	72
Tabela 5 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona (S_1) e Lupeol (S_2), isoladas e em par, sobre a germinação de sementes duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha - água destilada.	73
Tabela 6 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona (S_1) e Lupeol (S_2), isoladas e em par, sobre o desenvolvimento da radícula de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha - água destilada.	74
Tabela 7 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona (S_1) e Lupeol (S_2), isoladas e em par, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	74
Tabela 8 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona e Lupeol, isoladas e em par, sobre a germinação da planta daninha malícia,	

em função do pH da solução. Dados expressos percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AcOEt – Acetato de etila

CCVU – Coluna Cromatográfica por Via Úmida

CHCl₃ – Clorofórmio

DEPT – Distorsioneless Enhancement by Polarization Transfer

EBHA – Extrato Bruto Hidroalcoólico

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

MeOH – Metanol

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Tr – Tempo de retenção relativo

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 GERAL	21
2.2 ESPECÍFICOS	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 ALELOPATIA	22
3.1.2 Natureza dos compostos alelopáticos	25
3.1.3 Compostos químicos com efeitos alelopáticos	27
3.1.4 Vias de liberação e fatores que afetam a produção de aleloquímicos	29
3.1.5 Mecanismo de ação dos compostos alelopáticos	32
3.2 O MANEJO INTEGRADO DAS PLANTAS DANINHAS E A ALELOPATIA	35
3.2.1 A alelopatia e as plantas daninhas	36
3.2.2 A alelopatia e as pastagens	37
3.3 A ESPÉCIE <i>Acacia mangium</i>	38
3.3.1 Botânica	38
3.3.2 Usos	39
3.4 O GÊNERO <i>Acacia</i> E A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS	40
3.4.1 Triterpenóides	42
3.4.2 Flavonóides	44
4 METODOLOGIA	47
4.1 LOCAIS	47
4.2 COLETA DE MATERIAL VEGETATIVO	47
4.3 PREPARO DOS EXTRATOS	48
4.4 ESPÉCIES RECEPTORAS	49
4.5 BIOENSAIO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES	49
4.6 BIOENSAIO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS	51

4.7 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS	51
4.7.1 Coluna cromatográfica por via úmida	52
4.7.2 Cromatografia em camada delgada	53
4.7.2.1 Reunião das frações	54
4.7.3 Refracionamentos	55
4.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS	56
4.9 ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS	57
4.10 ANÁLISE DE HPLC PARA DETECÇÃO FLAVONÓIDES EM <i>Acacia mangium</i>	58
4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 BIOENSAIO DE GERMINAÇÃO COM EBHA	61
5.2 BIOENSAIO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS	61
5.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS	63
5.3.1 Lupenona	64
5.3.2 Lupeol	68
5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	73
5.4.1 Efeito alelopático das substâncias	73
5.4.2 Efeito do pH na atividade alelopática das substâncias	74
5.5 ANÁLISE POR HPLC PARA DETECÇÃO DE FLAVONÓIDES EM <i>Acacia mangium</i>	76
6 CONCLUSÕES	85

1 INTRODUÇÃO

A chamada agricultura moderna, onde altas produtividades são o foco da atividade, tem estado, sistematicamente, dependente do uso de insumos como os estimulantes do crescimento e de defensivos agrícolas sintéticos. Entretanto, o uso desses produtos tem provocado constantes insatisfações de ordem social em função dos riscos à saúde humana e dos prejuízos ambientais que promovem.

As plantas daninhas podem ser apontadas como o principal fator de ordem bioeconômica a impor limitações ao desempenho das atividades agrícolas desenvolvidas nas regiões tropicais. Dentre outros problemas ocasionados por essas plantas, pode-se destacar as perdas na produtividade, a redução na lucratividade dos cultivos, o aumento nos custos da atividade agrícola e perdas biológicas decorrentes da ação das plantas daninhas.

O controle adequado dessas plantas é de fundamental importância para os mais variados aspectos, como lucratividade, desempenho agrônômico, redução no capital aplicado anualmente na atividade e aumento na longevidade das mais variadas formas de utilização de solo.

Além do uso inadequado e indiscriminado de herbicidas sintéticos, trazendo contaminação dos alimentos utilizados na dieta dos animais e das pessoas, e exaurindo os recursos naturais, espécies de plantas resistentes aos atuais produtos comercializados são cada vez mais freqüentes nos cultivos (CHRISTOFFOLETI, 1994; LEBARON, 1992), levando à redução na eficiência dos produtos utilizados, o que redundará em aplicações mais freqüentes e em maior volume.

A biodiversidade brasileira pode oferecer excelente oportunidade para incrementar as pesquisas na busca de outros tipos de herbicidas, mais específicos e menos prejudiciais do que aqueles em uso atualmente.

Diminuindo os danos ambientais e prejuízos à saúde humana e procurando alternativas à resistência aos herbicidas do mercado, os inúmeros metabólitos produzidos pelas plantas podem fornecer surpreendente diversidade de estruturas químicas, as quais oferecem excelentes perspectivas, fazendo com que o interesse em produtos naturais como fonte de defensivos aumente (AN e PRATLEY, 2005; SOUZA FILHO et al., 2005; SOUZA FILHO et al., 2000).

A *Acacia mangium* é uma leguminosa originária da Austrália e Malásia (LORENZI, et al., 2003) que se adaptou muito bem ao clima tropical brasileiro. De desenvolvimento bastante rápido, é a espécie florestal mais plantada no mundo. O interesse nesta espécie para este estudo, entretanto, está no fato de que se observou que ela pode, por alelopatia, impedir a germinação de outras espécies (IPF, 2007). Semelhante atividade alelopática foi verificada em diversas espécies do gênero *Acacia* (OHNO et al., 2001).

O isolamento e a identificação de novas moléculas químicas e a caracterização das suas propriedades bioerbicidas são, portanto, o início de um caminho para se desenvolver produtos mais ecologicamente corretos e socialmente justos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Isolar, identificar as estruturas e caracterizar a atividade alelopática de substâncias químicas produzidas pela espécie *Acacia mangium*.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar o potencial alelopático de diferentes frações de planta da espécie *Acacia mangium*;
2. Determinar as propriedades alelopáticas de substâncias químicas (aplicadas em pré e pós-emergência) produzidas pela espécie *Acacia mangium*.
3. Determinar as variações na atividade alelopática das substâncias isoladas em função da variação do pH da solução.
4. Determinar a presença de flavonóides, com atividade alelopáticas comprovada, em diferentes partes da *Acacia mangium*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ALELOPATIA

A observação de que uma planta pode influenciar o desenvolvimento de outras ao seu redor não é recente. No século III a.C., Theophrastus, mencionado por Souza Filho e Alves (2002), notou que o grão de bico não revigorava o solo como outras plantas, ao contrário, o exauria, e, ao mesmo tempo, destruía as plantas invasoras. Posteriormente, DeCandolle, em 1823, verificou que os problemas de doenças nos solos e áreas agrícolas poderiam ter ocorrido devido ao exsudado das plantas cultivadas.

Lee e Monsi (1963) relataram a existência de um documento japonês de autoria de Banzan Kunazawa, escrito há 300 anos, o qual cita a presença de alelopatia em plantas de *Pinus densiflora*. O problema da “doença da terra” causada por plantas de trevo (*Trifolium pratense*) é conhecida na Europa desde o século XVII, quando Young, em 1804, chamou atenção para o fato, alegando que era causado pelo plantio sucessivo desta espécie (ALVES, 2008).

O termo "alelopatia" foi cunhado, em 1937, pelo pesquisador alemão Hans Molisch, com a reunião das palavras gregas "allelon" e "pathos", que significam, respectivamente, mútuo e prejuízo. Segundo Souza Filho e Alves (2002), atualmente, o termo alelopatia é entendido como sendo todo efeito direto e indireto de uma planta sobre outra, incluindo a participação dos microorganismos, através da produção de substâncias químicas que são liberadas para o meio ambiente.

É importante frisar que os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um dado composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no meio ambiente (RICE, 1979). Ademais, vale à pena ressaltar que o efeito

alelopático depende de um composto que é adicionado ao ambiente. Nesse sentido, uma planta pode afetar o crescimento da outra, sem que ocorra o efeito alelopático, mediante competição por fatores do ambiente, tais como água, luz e nutrientes (RODRIGUES et al., 1992).

Velini (1991) afirma que é extremamente difícil isolar os efeitos dos vários processos pelos quais as plantas afetam umas às outras, principalmente os efeitos da competição e da alelopatia, no que é corroborado por Mallik (2002), que complementa citando que a competição entre plantas reduz ou remove do ambiente um fator de crescimento necessário a ambas, enquanto na alelopatia ocorre a adição de um fator ao meio. Muller (1969) apresentou a sugestão do termo interferência para se referir ao conjunto de todos os efeitos deletérios de uma planta sobre outra. As causas potenciais da interferência incluem: 1. alelospolia ou interferência competitiva; 2. alelopatia ou interferência alelopática e 3. aleloagonismo ou parasitismo. Putnam e Tang (1986) acrescentaram ainda a alelomeiação ou fontes indiretas de interferência (por exemplo hábito alimentar de certos herbívoros).

A primeira demonstração científica da alelopatia foi realizada por Schreiner e Sullivan (1969), que demonstraram que a redução no desenvolvimento de feijão-miúdo (*Vigna unguiculata*) era devida à presença de compostos químicos e não à competição.

Carvalho (2008) citou outros termos afirmando que todas as substâncias químicas que envolvem a comunicação entre os seres vivos são chamadas de semioquímicos, dentre as quais estão os aleloquímicos, que se dividem em: cairomônios, quando a substância beneficia o receptor; alomônios, quando a substância química beneficia o emissor; sinomônio, quando as substâncias químicas trazem benefício mútuo e; apneumônio, quando as substâncias liberadas por matéria morta atraem parasitóides.

Há dois tipos de aleloquímicos produzidos por plantas: as fitotoxinas e as fitoalexinas. As primeiras são aleloquímicos continuamente produzidos pelas plantas, porém, quando esta é submetida a estresse, sua produção é aumentada. As fitoalexinas são produzidas somente quando a planta é submetida a estresse (PINTO et al., 2002).

Há ainda dois conceitos importantes a serem entendidos em alelopatia. Chama-se especificidade quando as plantas produzem substâncias químicas com propriedades alelopáticas que afetam ou não algumas espécies de plantas e, periodicidade, quando tais substâncias são encontradas distribuídas em concentrações variadas nas diferentes partes da planta e durante o seu ciclo de vida. Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes, causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microorganismos (CARVALHO, 1993; PIRES, 2001; SOUZA, 2003).

Dezenas de milhares de compostos secundários de plantas já foram isolados e estima-se que centenas de milhares existam na natureza. Há evidências de que a maioria dos metabólitos secundários liberados pelas plantas esteja envolvida em interações com outros organismos, como outras plantas, insetos, fungos e herbívoros, ou seja, apresentam potencial para exercer alelopatia em agroecossistemas (Duke, 1986).

Nos últimos anos, o impacto potencial da alelopatia sobre a agricultura tem sido discutido e descrito em detalhes. Segundo Weston (1996), Putnam e Tang, em 1974, foram os primeiros a explorar a possibilidade de utilização de culturas alelopáticas para inibir o crescimento de plantas daninhas em regiões agrícolas, incluindo o desenvolvimento de culturas supressoras de plantas daninhas e rotação de culturas.

3.1.2 Natureza dos compostos alelopáticos

Rice (1984) afirmou a existência de mais 300 compostos secundários vegetais e microbiológicos, entre os agentes alelopáticos, pertencentes a muitas classes de produtos químicos, e esse número continua aumentando com a realização de novas pesquisas. A origem de um aleloquímico freqüentemente é obscura e sua atividade

biológica pode ser reduzida ou aumentada pela ação microbiológica, oxidação e outras transformações.

Possíveis fontes de aleloquímicos no ambiente das plantas incluem numerosos microrganismos, certas invasoras, uma cultura anterior ou mesmo a cultura atual. Similarmente, as espécies afetadas podem ser os microrganismos, as invasoras ou a cultura (EINHELLIG, 1996).

Quando o composto liberado causa somente efeitos prejudiciais, recebe também o nome de toxina, fitotoxina, regulador de crescimento, agente aleloquímico ou agente alelopático (CHOU, 2006). Esses compostos podem ser produzidos em qualquer parte das plantas (folhas, caules, raízes, rizomas, flores e sementes) e a sua concentração varia de espécie para espécie e, numa mesma espécie, de acordo com a parte da planta e o seu estágio de desenvolvimento. As folhas e as raízes são as fontes mais importantes de aleloquímicos (RODRIGUES, ALMEIDA e RODRIGUES, 1993; WESTON, 1996), pois nessas partes da planta estes compostos aparentemente se apresentam em maior concentração.

Na Figura 1, Rezende et al. (2000), apresentaram alguns produtos químicos alelopáticos e as rotas prováveis de síntese dos mesmos.

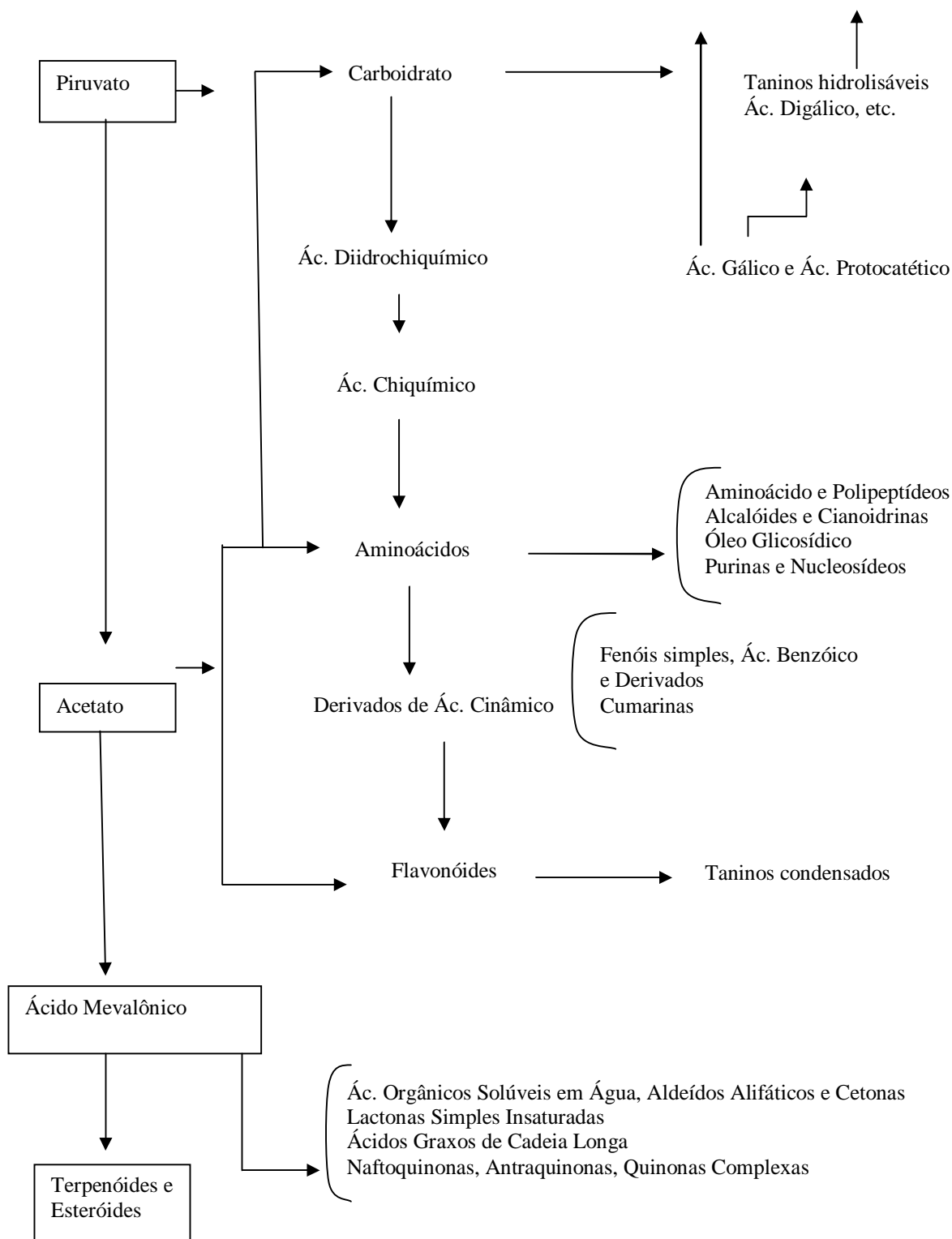


Figura 1. Rotas prováveis de síntese de alguns grupos de aleloquímicos. (Fonte: REZENDE et al., 2000)

3.1.3 Compostos químicos com efeitos alelopáticos

Vários tipos de compostos orgânicos foram identificados como aleloquímicos, produzidos por microrganismos ou plantas superiores (RICE, 1984), podendo ser relacionados como principais os seguintes:

- Ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia reta, aldeídos alifáticos e cetonas; ácidos cítrico, málico, acético e butírico; metanol, etanol e acetaldeído;
- Lactonas insaturadas simples: patulina e ácido parasórbico;
- Ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos: oléico, esteárico, mirístico e agropireno;
- Naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas: julglona, tetraciclina e aureomicina;
- Fenóis simples, ácido benzóico e derivados: ácido gálico, vanílico e hidroquinona;
- Ácido cinâmico e derivados: ácido clorogênico e ferúlico;
- Coumarinas: escopoletina e umbeliferona;
- Flavonóides: quercetina, florizina e catequina;
- Taninos condensados e hidrolisáveis: ácidos elágico e digálico;
- Terpenóides e esteróides: cineole, cânfora e limoneno;
- Aminoácidos e polipeptídeos: marasmina e victorina;
- Alcalóides e cianoidrinas: estriquinina, atropina, codeína, cocaína e amidalina;
- Sulfetos e glicosídeos: sirigrina e alilisotiocianato;
- Purinas e nucleosídeos: cordicepina, teofilina e paraxantina.

Compostos biologicamente ativos obtidos das plantas estão sendo usados no controle de espécies daninhas (muitas das quais apresentavam resistência a várias categorias de herbicidas usualmente empregados), de insetos e de microrganismos patogênicos, podendo constituir-se em uma alternativa ao uso dos defensivos agrícolas, com menores riscos ao meio ambiente, mantendo um melhor equilíbrio do ecossistema (RIZVI, 1992; CHOU, 1998), embora sejam poucos os produtos naturais empregados diretamente como herbicidas.

Os aleloquímicos podem ser usados diretamente como herbicidas ou para conduzir o desenvolvimento de novas classes de herbicidas. O interesse em produtos naturais como fonte de defensivos químicos está aumentando (AN e PRATLEY, 2005).

Os estudos nessa área tem chegado ao isolamento de algumas importantes substâncias, as quais promovem elevada toxicidade em algumas espécies de plantas daninhas. O Bialafós, produzido por *Streptomyces* spp. em fermentação, é metabolicamente convertido pela espécie alvo a fosfinotricina, um potente inibidor da glutamina sintetase; ele possui um uso limitado no Japão. Por outro lado, o glufosinato, uma versão sintética da fosfinotricina, é amplamente utilizado pelo mundo como herbicida não seletivo. O ácido pelargônico, um ácido graxo natural, possui uma distribuição limitada nos EUA como herbicida natural (DUKE, et al., 2002).

Souza e Furtado (2002) observaram que o aleloquímico benzoxazolinona (BOA), exsudado pelas plantas de centeio (*Secale cereale*), confere resultado semelhante ao herbicida atrazine sobre plantas de alface (*Lactuca sativa*).

A quinona, chamada sorgoleona (Figura 2), é um aleloquímico que foi obtido a partir do exsudado das raízes de sorgo (*Sorghum* spp.) (NETZLY E BUTLER, 1986 apud DUKE et al., 2002). O derivado fenólico grabdinol (Figura 3) é um composto floriglucinol-afim que inibe a germinação, transpiração e abertura estomacal (YONEYAMA et al., 1996 apud DUKE et al., 2002). Um exemplo mais recente é o composto policarbonilado leptospermone (Figura 4), do qual a classe Triquetona de herbicidas foi desenvolvida (MITCHELL et al., 2001 apud DUKE et al., 2002). O aleloquímico leptospermone foi encontrado em uma espécie australiana nativa, Bottlebrush (*Callistemon citrinus*), que foi introduzida na Grã-Bretanha em 1789. Do leptospermone foi desenvolvido o herbicida Calisto® (Mesotrione), sendo este talvez o mais bem sucedido herbicida comercial desenvolvido a partir de um aleloquímico. Calisto® foi liberado para o mercado mostrando boa eficácia para o controle de espécies daninhas da cultura de milho e um bom perfil ambiental (CORNES, 2005).

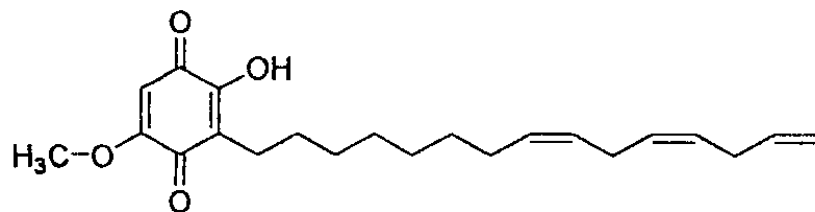


Figura 2. Sorgoleona

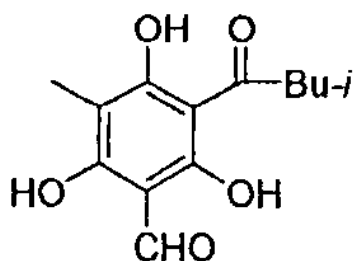


Figura 3. Grabdinol

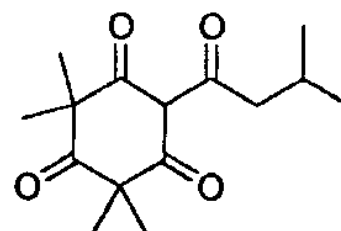


Figura 4. Leptospermone

3.1.4 Vias de liberação e fatores que afetam a produção de aleloquímicos

Todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar compostos alelopáticos, embora as plantas cultivadas e suas variedades comerciais tenham perdido muito essa capacidade, a qual era mais comum nos precursores silvestres das atuais plantas cultivadas, que se adaptaram para competir com outras plantas, garantindo não só a formação de estandes puros, como também a defesa contra insetos (BANSAL; BHAN, 1993).

Os compostos alelopáticos podem ser liberados das plantas por lixiviação a partir dos tecidos, volatilização, exsudação pelas raízes e decomposição de resíduos da

planta (SOUZA, 1988; RODRIGUES et al., 1992; WEIDENHAMER, 1996), do seguinte modo:

- **Lixiviação:** entende-se por lixiviação a remoção das substâncias químicas das plantas, vivas ou mortas, por ação da água, o que na natureza se processa através de chuva, orvalho ou neblina (CHOU, 2006). As toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes ou, ainda, dos resíduos vegetais em decomposição (ALMEIDA, 1985). Os compostos lixiviados contêm compostos orgânicos e inorgânicos tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (SOUZA, 1988). A atividade destes compostos no solo é normalmente transitória, uma vez que são sujeitos à ação de microorganismos. No caso de decomposição, devem ser ainda consideradas as substâncias produzidas pelos microorganismos envolvidos no processo, muitas das quais são poderosas toxinas (PUTNAM e TANG, 1986).
- **Decomposição de resíduos:** toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microorganismos (SILVA, 1978). Perdas da integridade de membranas celulares permitem a liberação de um grande número de compostos, tais como ácidos fenólicos, agropireno, cumarinas (SILVA, 1978) e flavonóides (RICE, 1984), os quais impõem toxicidade, de uma maneira aditiva ou sinérgica à dos lixiviados, aos organismos vizinhos (SOUZA, 1988),
- **Volatilização:** compostos aromáticos são volatilizados das folhas, flores, caules e raízes e podem ser absorvidos por outras plantas (ALMEIDA, 1985). Nesse grupo, encontram-se compostos como o gás carbônico (CO₂), a amônia (NH₃), o etileno e os terpenóides, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos (CHOU, 2006). Esses últimos atuam sobre as plantas vizinhas por meio dos próprios vapores ou condensados no orvalho ou, ainda, alcançam o solo e são absorvidos pelas raízes (SOUZA, 1988).
- **Exsudação radicular:** um grande número de compostos alelopáticos são liberados na rizosfera circundante e podem atuar direta ou indiretamente nas interações planta/planta e na ação de microorganismos (TUKEY JÚNIOR, 1969). Entre esses compostos, podem ser citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido transcinâmico (SILVA, 1978; SOUZA, 1988).

A inibição alelopática resulta da ação conjunta de um grupo de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos e dependem da extensão dos estresses bióticos e abióticos associados. A alelopatia está estreitamente ligada a outros estresses ambientais, incluindo temperaturas extremas, deficiências de nutrientes e de umidade, radiação, insetos, doenças e herbicidas (EINHELLIG, 1996). Essas condições de estresse, frequentemente, aumentam a produção de aleloquímicos, aumentando o potencial de interferência alelopática (EINHELLIG, 1995).

Verifica-se, na Figura 5, que após a liberação pela “planta doadora”, um composto aleloquímico pode seguir por diferentes vias (ou ser alterado), até causar o efeito alelopático na “planta receptora”.

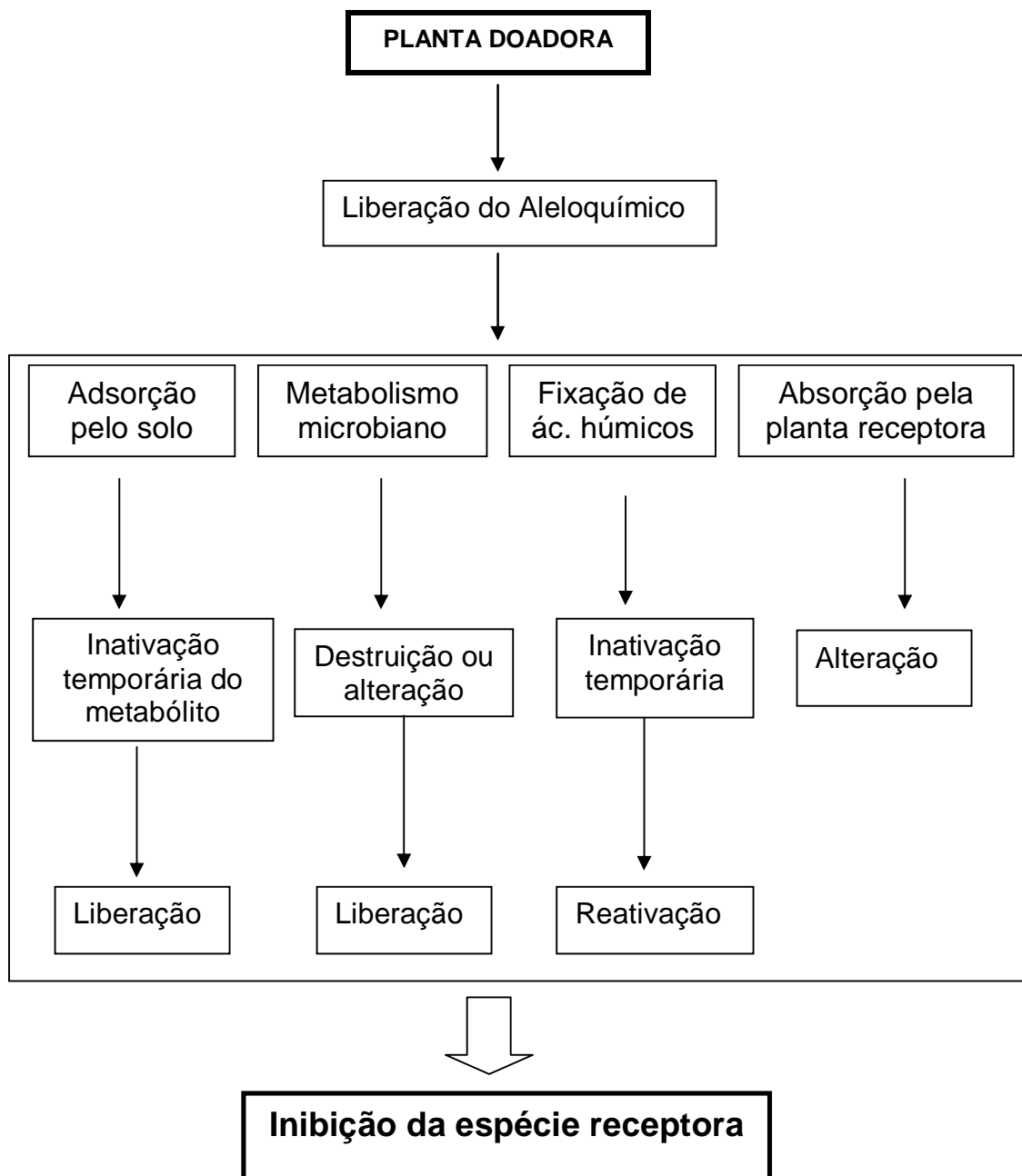


Figura 5. Vias prováveis seguidas por compostos aleloquímicos da liberação pela planta doadora até causar o efeito alelopático na espécie receptora. (Fonte: Rezende et al., 2000)

Rodrigues et al. (1993) afirmam, conforme também se verifica na Figura 5, que as interações que ocorrem são muito complexas, pois os produtos químicos presentes no meio podem vir diretamente de um simples organismo, de plantas ou surgirem como resultado dos processos de decomposição e formação do húmus no solo. Além disso, a quantidade e a natureza química dos compostos alelopáticos liberados variam com a espécie e idade da planta, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera e tipo de solo (EINHELLIG, 1995).

3.1.5 Mecanismo de ação dos compostos alelopáticos

Nas plantas, as substâncias alelopáticas desempenham as mais diversas funções, sendo responsáveis pela prevenção da decomposição das sementes, interferem na sua dormência e também na das gemas e influenciam as relações com outras plantas, com microrganismos, com insetos e até com animais superiores, incluindo o homem (DURIGAN; ALMEIDA, 1993). Como exemplos, os autores citam que a resistência da cevada (*Hordeum vulgare*) ao pulgão (*Schizaphis graminium*) é conferida pelos fenóis e derivados que contêm e que as lecitinas presentes nas sementes de muitas leguminosas as tornam repelentes a algumas espécies de insetos.

Os conhecimentos dos efeitos alelopáticos e dos mecanismos de ação de várias substâncias são importantes para se entender as interações entre plantas, tanto nos ecossistemas naturais, como nos agrícolas. A grande diversidade dos compostos que causam alelopatia indicam diferentes mecanismos de ação (EINHELLIG, 1995).

Rice (1984) menciona que os efeitos podem ocorrer sobre:

- a regulação do crescimento (divisão celular, síntese orgânica, interação com hormônios, efeito sobre enzimas, metabolismo respiratório);
- a abertura dos estômatos e fotossíntese;
- a absorção de nutrientes;
- a inibição da síntese de proteínas;

- as mudanças no metabolismo lipídico.

Os aleloquímicos interferem não somente na germinação e crescimento das plantas, mas em atividades vitais, como nas atividades enzimáticas, na fotossíntese, na respiração, na permeabilidade da membrana, na assimilação de nutrientes e em síntese de proteínas (RICE, 1984; ALMEIDA, 1988; PIRES, 2001).

Atividades enzimáticas são afetadas por taninos e fenóis, podendo inibir a atividade das celulases, poligalacturonases, pepsina, proteinases, desidrogenases e descarboxilases (JAIN; SRIVASTAVA, 1981; INDERJIT, 1995b; YU *et al.*, 2003). A inibição dessas enzimas deve-se à capacidade de taninos e fenóis se ligarem às proteínas, formando complexos reversíveis, via pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, ou complexos irreversíveis, que ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes (MELLO e SANTOS, 2001).

A fotossíntese e a atividade respiratória são inibidas por quinonas, ácidos vanílico, ferúlico, cumárico e caféico (RIZVI e RIZVI, 1992; HEJL *et al.*, 1993; JOSE e GILLESPIE, 1998; BARKOSKY *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-BERNARDO *et al.*, 2003). Outros compostos, como ancecalina, euparina e dimetilencecalina, extraídos de raízes de *Helianthella quinquenervis*, também inibem a fotossíntese (CASTAÑEDA *et al.*, 1996). Da parte aérea de uma Asteraceae (*Piqueria trinervia*) foram extraídos monoterpenos, demonstrando serem inibidores do fluxo de elétrons da fotossíntese (ANAYA *et al.*, 1996). Os compostos como benzopiranos, lactonas, terpenos e fenilpropanóides, isolados de espécies vegetais, atuam como inibidores da reação de Hill, assim como algumas cumarinas e lactonas sesquiterpênicas que agem como desacopladores e inibidores da transferência de elétrons (KING-DIAZ *et al.*, 2001).

O crescimento por divisão celular é inibido por cumarinas, derivados fenólicos e alguns monoterpenos e sesquiterpenos (INDERJIT, 1995a; GALINDO *et al.*, 1999; CHON *et al.*, 2002).

Avaliações fisiológicas e bioquímicas realizadas com alguns aleloquímicos em plantas de cultivo mostraram que também as culturas são afetadas por essas substâncias. Em plantas de *Glycine max* e *Zea mays*, o ácido salicílico, em elevadas concentrações, afetou severamente o crescimento, a transpiração e o potencial hídrico

dessas espécies (BARKOSKY e EINHELLIG, 1993). A permeabilidade das membranas das raízes de soja em contato com ácido benzóico e ácido cinâmico em diferentes concentrações reduzia, à medida que as concentrações desses aleloquímicos aumentavam (BAZIRAMAKENGA *et al.*, 1995). O derivado fenólico juglona reduziu a taxa fotossintética, a respiração e a transpiração em plantas de milho e soja, demonstrando que a soja foi mais sensível a esse aleloquímico (JOSE e GILLESPIE, 1998).

3.2 O MANEJO INTEGRADO DAS PLANTAS DANINHAS E A ALELOPATIA

O sucesso no manejo de plantas daninhas depende do conhecimento e do uso integrado dos diferentes métodos de controle, como preventivo, cultural, mecânico, biológico e químico (ANAYA, 1999; CHOU, 1998; RIZVI *et al.*, 1999). O controle dessas plantas, mediante princípios ativos extraídos de vegetais com significativo poder alelopático, torna-se importante devido ao caráter seletivo de sua atividade, além de possuir um baixo poder residual.

Sabendo-se que a alelopátia pode se tornar importante fator de manejo utilizando-se plantas que exercem controle sobre determinadas espécies indesejáveis, é possível também usar espécies de gramíneas e leguminosas pouco alelopáticas entre si quando do estabelecimento de pastagens. Os resultados são ecossistemas mais equilibrados, com reflexos positivos em produtividade e longevidade dessas pastagens.

O melhoramento de cultivares é a única área que não tem sido suficientemente explorada como uma estratégia de manejo das plantas daninhas. Por exemplo, a possibilidade de incorporar características alelopáticas em cultivares melhorados de arroz que poderiam reduzir a necessidade de aplicar herbicidas ao cultivo deveria ser cuidadosamente considerada (Khush, 1996). Duke *et al.* (2001) afirmaram que ainda não se tem obtido cultivares comerciais com propriedades alelopáticas.

Tem recebido grande atenção o potencial alelopático do arroz contra *Heteranthera limisa* (Dilday *et al.*, 1991), como também se tem informação do potencial

alelopático de numerosos cultivos como a cebola (Lovett e Houlst, 1995), pepino (Putman e Duke, 1974), aveia (Fay e Duke, 1977), sorgo (Nimbal et al., 1996), girassol (Leather, 1983), tabaco (Patrick et al., 1963) e trigo (Wu et al., 1999).

Embora o enfoque do fitomelhoramento por si só não possa solucionar os problemas causados pelas plantas daninhas, um incremento no potencial alelopático das variedades alvo de seleção, pode trazer um grande impacto sobre os sistemas de produção, tanto os de baixo quanto os de altos insumos.

Algumas leguminosas utilizadas como adubo verde possuem efeito alelopático sobre plantas invasoras (ABBADO, 2008).

A capacidade supressora de plantas daninhas por culturas de cobertura é amplamente reconhecida e explorada (Putnam et al., 1983; Almeida, 1988; TREZZI, 2004; Theisen et al., 2000). A supressão pode ocorrer tanto durante o desenvolvimento vegetativo das plantas cultivadas, quando efeitos competitivos e alelopáticos poderiam influenciar o desenvolvimento das plantas daninhas, quanto após a dessecação das plantas cultivadas, em que principalmente efeitos físicos (Vidal, 1995) e também de liberação de substâncias alelopáticas (Almeida, 1988) poderiam resultar em supressão.

3.2.1 A alelopátia e as plantas daninhas

Segundo Souza Filho (2006), um dos fatores mais importantes a impor limitações ao desenvolvimento da atividade agrícola no mundo, em geral, e nos trópicos em particular, é, sem dúvida, as plantas daninhas. Tais plantas concorrem com as culturas em termos de luz, de nutrientes, de água, e de espaço físico e, especificamente em áreas de pastagens cultivadas, arranham os animais, o que desvaloriza o couro, além disso, quando tóxicas, podem matá-los. Muzic (1970) salientou que as plantas daninhas causam mais perdas e danos à agricultura do que as pragas e doenças das plantas cultivadas e se constituem na maior barreira para o desenvolvimento econômico de muitas regiões do mundo. Apesar de toda a tecnologia disponível hoje para a

agricultura moderna, 12% de toda a produção agrícola é perdida anualmente por causa das plantas daninhas e 60% de todos os pesticidas comercializados são herbicidas (ANAYA, 1999; NARWAL, 1996). Esses dados deixam claro a importância das plantas daninhas para a atividade agrícola.

As plantas daninhas têm obtido sucesso ecologicamente porque sobrevivem melhor do que as plantas cultivadas a situações de estresse, porque possuem maior capacidade para explorar os fatores ambientais essenciais ao crescimento, reduzindo a disponibilidade desses fatores para as plantas de interesse agrônomo (SOUZA FILHO et al., 2000b). O sucesso das plantas daninhas nos diferentes sistemas de cultivo pode estar associado à capacidade que essas plantas possuem para produzir, estocar e liberar, para o ambiente, substâncias químicas com propriedades alelopáticas, que são absorvidas pelas plantas cultivadas, refletindo de forma determinante no padrão e na densidade da comunidade (RICE, 1984).

Diversas espécies de plantas daninhas estão sendo estudadas quanto ao seu potencial alelopático, tais como *Ageratum conyzoides*, *Amaranthus lividus*, *Bidens pilosa*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria plantaginea*, *Cassia occidentalis*, *Commelina nudiflora* e *Cyperus rotundus* (SOUZA, 2003, SOUZA FILHO et al., 2006c; SOUZA FILHO, 2006b; YAMAGUSHI et al., 2007, ALVES, 2008).

3.2.2 A alelopatia e as pastagens

Na região amazônica e demais regiões pastoris do Brasil, as plantas forrageiras se constituem, senão na única, mas na principal fonte de alimento para os bovídeos, representando fator primordial para o sucesso da atividade pecuária, quer em bases agrônomicas quer em bases financeiras. Dessa forma, manter as plantas forrageiras produtivas ao longo do ano é um desafio que os produtores precisam enfrentar com determinação e tecnologia (SOUZA FILHO, 2006a).

Embora, nas últimas três décadas, o desenvolvimento de cultivares forrageiras adaptadas para a região dos trópicos, incluindo a Amazônia, tenha sido de grande valia, aspectos importantes como as propriedades químicas das espécies forrageiras, deixaram de ser abordados.

A identificação de forrageiras alelopáticas e o conhecimento dos mecanismos pelos quais elas exercem seus efeitos no ambiente revestem-se de grande importância, por propiciar um manejo mais adequado dessas plantas, com vistas a aumentar a produtividade e a persistência das pastagens (REZENDE, 2000).

Algumas gramíneas forrageiras como *Brachiaria brizantha* (CARVALHO, 1993 apud SOUZA FILHO, 2006a) e *Brachiaria decumbens* (ALMEIDA, 1993 apud SOUZA FILHO, 2006) tiveram sua atividade potencialmente alelopática determinada.

O conhecimento da atividade alelopática em leguminosas forrageiras é importante para se manejar o estabelecimento e a estabilidade das pastagens consorciadas (SOUZA FILHO, 2006a).

Carvalho et al. (2002), utilizaram extratos aquosos de duas leguminosas (*Canavalia ensiformes* e *Stilozobium aterrimum*) sobre a planta daninha tiririca (*Cyperus rotundus*) e observaram que o extrato aquoso da *S. aterrimum* (mucuna preta) reduziu a quantidade de massa verde e matéria seca da parte aérea, da raiz e o índice de velocidade de emergência da tiririca, além de estabilizar o número de tubérculos, caracterizando um possível efeito alelopático.

3.3 A ESPÉCIE *Acacia mangium*

3.3.1 Botânica

Acacia mangium Willd., cujo nome popular é acácia-australiana, é da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae. É uma árvore perenifolia, de 10 – 15 m de altura, originária da Austrália e Malásia, de tronco ereto, cinza-pardo, com casca pouco saliente e levemente sulcado longitudinalmente. Ramificação fina, horizontal, espaçada, formando opa ovalada com folhagem densa. Folhas simples, alternas, em ramos verdes, alados, dispostos espiraladamente, ovalado-lanceoladas ou ovalado-alongadas, largas, coriáceas, de pecíolo curto, ápice alongado, com nervuras salientes partindo da base, de 12-18 cm de comprimento. As folhas são filódios permanentes que não evoluíram, não dando origem às folhas verdadeiras que deveriam ser pinadas. Inflorescências brancas, axilares, sem atrativo ornamental, com flores globulares brancas e estames numerosos. Frutos do tipo vagem, espiralados ou torcidos, marrons, curtos, deiscentes, com sementes pretas, pequenas, pendentes nas vagens por um filamento amarelo, formadas de setembro a novembro. A multiplicação é exclusivamente por sementes, cuja produção anual é abundante nas condições do sudeste do Brasil onde é mais cultivada (LORENZI et al., 2003).

3.3.2 Usos

A árvore é dotada de copa densa e elegante, características estas que a recomendam para usos com fins paisagísticos. É adequada para arborização urbana e rural, bem como para reflorestamentos destinados à produção de lenha. Possui rápido crescimento e grande rusticidade em nossas condições tropicais (Lorenzi et al., 2003).

O gênero *Acacia*, com aproximadamente 2.000.000 ha plantados em todo o mundo, apresenta uma relevante importância do ponto de vista social e industrial no reflorestamento. As espécies de maior utilização são *Acacia mangium* e *Acacia auriculiformis* sendo suas produções direcionadas para polpa de celulose, madeira para movelaria e construção, matéria-prima para compensados, combustível, controle de erosão, quebra-vento e sombreamento (MARSARO JR, 2008).

A *Acacia mangium* é a espécie florestal mais plantada, com uma área comercialmente explorada no planeta de aproximadamente 600 mil hectares. Atualmente, é a mais utilizada no Sudeste Asiático, principalmente na Indonésia e na Malásia. A espécie é uma leguminosa pioneira e vem despertando a atenção dos técnicos e pesquisadores pela rusticidade, rapidez de crescimento e, principalmente, por ser espécie nitrificadora (IPF, 2007).

O interesse também parte por ela apresentar significativa capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras, sobretudo em solos pobres, ácidos e degradados produzindo elevada quantidade de madeira com baixa acumulação de nutrientes. Assim, a espécie destaca-se em programas de recuperação de áreas degradadas (RAD) e representa uma opção silvicultural para o Brasil (IPF, 2007).

3.4 O GÊNERO *Acacia* E A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

A família *Leguminosae* é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreendendo mais de 13.000 espécies reunidas em mais de 600 gêneros distribuídos mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ANDRADE, 2003a).

A subfamília *Mimosoideae*, encontra-se distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas, com 50 a 60 gêneros que englobam aproximadamente 2.800 espécies, em sua maioria pertencentes aos gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (BARROSO, 1991).

O gênero *Acacia* é um dos maiores nas Angiospermas, encontram-se como árvores, arbustos ou trepadeiras lenhosas (BURKART, 1979) e existem cerca de 1350 espécies de *Acacia* encontradas em todo o mundo. São encontradas em regiões tropicais e subtropicais, sendo muito abundantes em savanas e matas, bem como em matas xerófitas, na América tropical, África, Ásia e Austrália, sendo que nesta última existem perto de 1.000 espécies (ANDRADE, 2003a; AN e PRATLEY, 2005).

No gênero *Acacia*, foi verificada atividade alelopática com várias espécies, interferindo na germinação e/ou no crescimento de diferentes espécies que se desenvolvem ao seu redor (OHNO et al., 2001).

Observou-se que sementes de arroz embebidas com o lixiviado das folhas da *A. auriculiformis* sofriam redução da germinação, do crescimento e da matéria seca acumulada da plúmula (JADHAV e GAYNAR, 1992).

Extratos dos resíduos da decomposição da *A. menoxylon* em quatro diferentes tipos de solo foram avaliados. Efeito inibitório sobre o crescimento da *Lactuca sativa* foi observado para os extratos dos resíduos do início da decomposição (GONZÁLES; SOUTO e REIGOSA, 1995).

Potencial efeito alelopático sobre o milho (*Zea mays*) foi verificado pelas substâncias produzidas pela *Acacia xanthopholea* (NSOLOMO; MRECHA e MAGHEMBE, 1995).

O potencial alelopático da *Acacia podalyriaefolia* A. Cunn. (Leguminosae-Mimosoideae), conhecida como Acácia-mimosa, amplamente cultivada no Brasil como planta ornamental, foi avaliado no estudo de Andrade et al. (2003b), o qual demonstrou que o extrato etanólico bruto e suas frações diclorometano e acetato de etila tem influência significativa sobre a germinação e crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*. O efeito verificado foi de estímulo da germinação das sementes, porém sem o desenvolvimento dos folíolos tornando as mudas inviáveis.

Os extratos aquosos foliares de *Acacia leucopholea* mostraram efeitos inibitórios sobre a germinação de sementes, desenvolvimento do hipocótilo, comprimento radicular, área foliar e produtividade das plantas cultivadas *Arachis hypogaea* (amendoim) e de *Sorghum vulgare* (sorgo). O efeito inibitório do cultivo destas plantas é diretamente proporcional ao aumento da concentração (5%, 10%, 15%, 20%) dos extratos aquosos foliares de *Acacia leucopholea* (JAYAKUMAR e MANIKANDAN, 2005).

3.4.1 Triterpenóides

Dixon e Sumner (2003) afirmaram que todas as classes conhecidas de terpenóides foram notificadas em leguminosas. As diferentes classes de terpenóides são os mono- (C10), sesqui- (C15), di- (C20), tri- (C30) e tetraterpenóides (C40). Terpenóides são o segundo maior grupo (depois dos fenólicos) de metabólitos secundários implicados na alelopatia (INDERJIT e KEATING, 1999).

Alguns triterpenóides pentacíclicos foram encontrados em diversas espécies do gênero *Acacia*, os quais foram compilados por Ahmad e Atta-ur-Rahman (1994). Na *Acacia concinna* DC. foram isolados o acacidiol (3 β ,21 β -Diidróxi-28-noroleano-16,18-dieno) e o ácido acácico (ácido 3 β ,16 α ,21 β -Triidroxioleano-12-en-28-óico), este último também encontrado na *Acacia intsia* Willd. A lactona do ácido acácico (3 β ,16 α -diidroxioleano-12-en-28,21 β -olídeo) foi isolada da *Acacia auriculiformis* A.Cunn. Outras substâncias foram isoladas da *Acacia concinna* DC., como a lactona do ácido acetil acácico (3 β -Acetoxi-16 α -hidroxioleano-12-en-28,21 β -olídeo) e a acacigenina-B [ácido 3 β ,16 α -Diidróxi-21 β -{3-(4''-etilidenetetrahydro-2''-furanil)-2'-metil-1'oxo-2'-propenil}oxioleano-12-en-28-óico]. As estruturas estão representadas na figura a seguir.

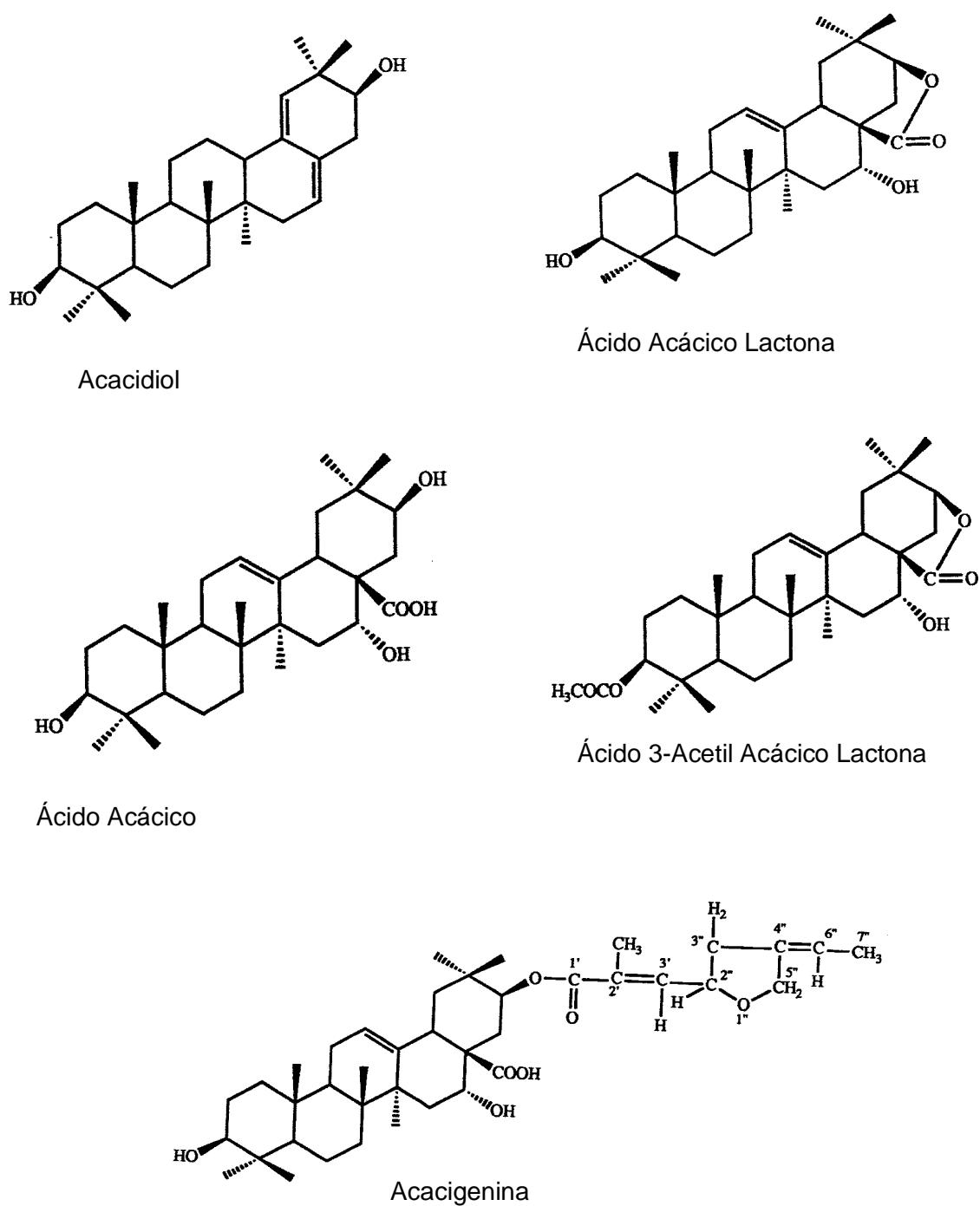


Figura 6. Triterpenos pentacíclicos isolados de espécies do gênero *Acacia*.

Os arbustos de deserto do gênero *Acacia* contêm saponinas triterpênicas conhecidas como avicinas nas vagens do fruto, certamente para proteger as sementes dos predadores. Estes compostos formados pelo ácido acácico conjugado com sete

açúcares e dois monoterpenos lineares estão sendo desenvolvidos como agentes anticancerígenos por sua habilidade para induzir a detenção do ciclo celular dos mamíferos (HARIDAS et al., 2001 apud FELIPE e POZUELO, 2006).

No México, algumas espécies do gênero *Acacia* são usadas na medicina folclórica para o tratamento de câncer, infecções respiratórias, dores de cabeça e paludismo. A *Acacia pennatula*, por exemplo, é usada na medicina tradicional no tratamento de câncer e é encontrada em todo o Sul do país. Foram isoladas quatorze substâncias de folhas caídas de *Acacia pennatula*, dentre elas lupenona, lupeol e stigmasterol. Os esteróis, triterpenos lupanos e flavonóides encontrados foram anteriormente isolados de plantas de *Acacia*, mostrando que as espécies desse gênero tem características químicas semelhantes (RIOS, 2005).

3.4.2 Flavonóides

A presença de altas concentrações de flavonóides é uma característica das leguminosas em geral (SANNOMIYA, 2001).

Diversos metabólitos secundários como as cumarinas, taninos, glicosídeos e cianogênicos, alcalóides, esteróides e flavonóides foram verificados no gênero *Acacia*. Os flavonóides correspondem ao grupamento químico predominante neste gênero (ANDRADE, 2003a). Na obra citada, a autora lista grande quantidade de substâncias identificadas e testadas para atividades biológicas diversas, incluindo a alelopática.

Saffan e Salama (2005) estudaram o impacto do potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Acacia raddiana*, sobre a germinação do tremoço (*Lupinus albus*) e o acúmulo de compostos nas plântulas dessa espécie, e observaram que as substâncias acumuladas foram compostos fenólicos e flavonóides já implicados como agentes aleloquímicos.

O flavonóide rutina foi o aleloquímico que provavelmente provocou diferença positiva nos efeitos inibitórios na análise de potencial alelopático de três variedades de

trigo sarraceno, sendo o trigo mourisco (*Fagopyrum sculentum* Moench) o que demonstrou maior potencial alelopático (KALINOVA, 2008).

Dois novos flavonóides, quercetina 4'-O- α -L-ramnopiranosil-3-O- β -D-alopiranosídeo e apigenina 6-C-[2''-O-(E)-feruloil- β -D-glicopiranosil]-8-C- β -glicopiranosídeo foram isolados de folhas de *Acacia pennata* Willd. (*Mimosoideae*) e testadas para verificar atividade anti-inflamatória (ALAIN et al., 2007).

Rolim de Almeida et al. (2008) avaliaram a atividade alelopática das folhas de *Leonurus sibiricus* sobre a germinação e crescimento inicial de *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa*, e *Lepidium sativum*. Análises químicas mostraram a presença nas folhas de quatro grandes flavonóides; entre os quais a quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1, 6)- β -D-galactopiranosídeo; e de três compostos flavônicos menores, entre eles a quercetina. Os flavonóides isolados apresentaram diferentes atividades biológicas, variando com a concentração das substâncias.

Catequina e epicatequina (Figura 7) foram isoladas de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench.) e testados seus efeitos alelopáticos sobre o desenvolvimento da radícula da alface (*Lactuca sativa*), chegando a uma inibição de 50% (GOLISZ, et al., 2007).

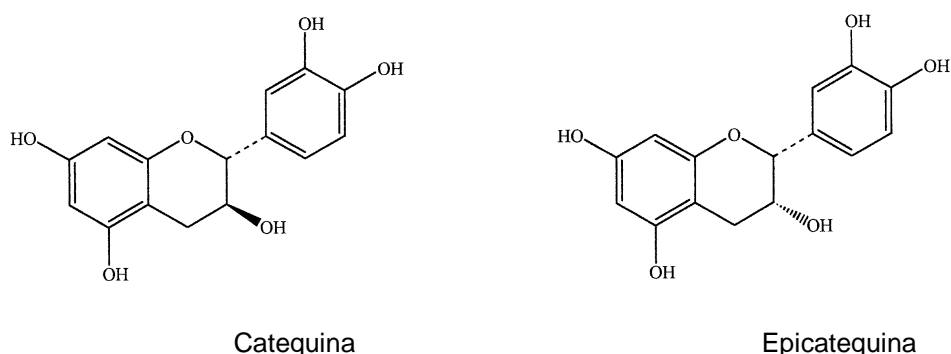


Figura 7. Fórmulas estruturais da catequina e da epicatequina.

Lôbo et al. (2008) observaram que a catequina e a epicatequina, isoladas da leguminosa *Tachigali myrmecophyla* apresentaram significativa atividade alelopática sobre o desenvolvimento inicial das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) - chegando a uma inibição em torno de 72%, sobre o desenvolvimento da radícula e hipocótilo, na maior concentração testada da catequina (20 mg/L) -, e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), com uma inibição de 80 a 85%, sobre o desenvolvimento da radícula e hipocótilo, também na maior concentração testada de catequina. O efeito da epicatequina foi menos expressivo e com maior variação dependendo do fator da planta analisado e da espécie, oscilando entre 20 e 75%. Já para a germinação, os resultados mais expressivos foram com a epicatequina, chegando a mais de 70% na malícia, enquanto que com catequina a inibição na mesma espécie foi inferior a 35%.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAIS

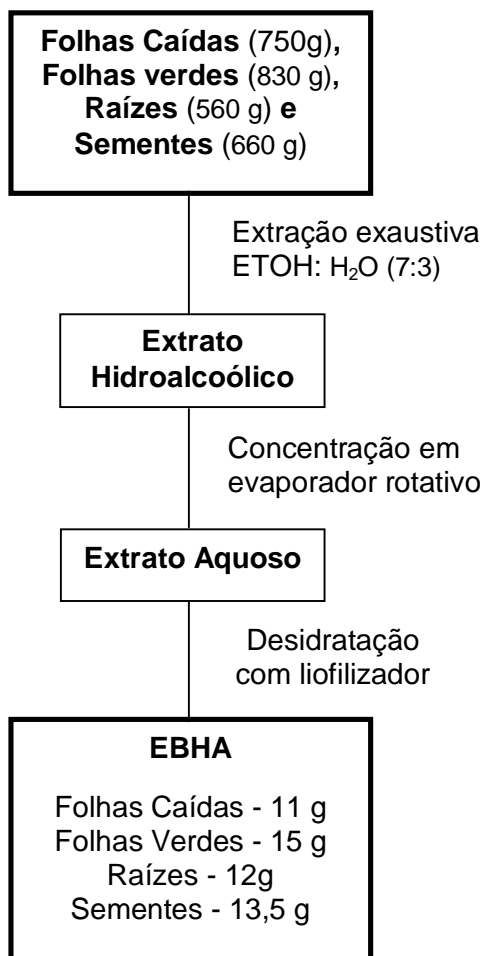
Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Agroindústria, setor de Ecologia Química, da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil; no Laboratório de Química / Pesquisa da Universidade Federal do Pará e no Laboratório de Cromatografia Líquida da Universidade Federal do Pará.

4.2 COLETA DE MATERIAL VEGETATIVO

Diferentes frações de plantas de *Acacia mangium* foram coletadas na área da Embrapa Amazônia Oriental, localizada no município de Belém, Estado do Pará, em janeiro de 2007. Coletaram-se folhas (pecíolo alado e filídeos) verdes, folhas secas caídas no solo e raízes da planta. Por ocasião da coleta, as plantas não estavam florando ou produzindo sementes, dessa forma as sementes foram adquiridas em produtores da Zona Bragantina. O material colhido foi seco em estufa com circulação de ar forçado, em temperatura de 40 °C, até peso constante. Em seguida processou-se a trituração em moinho tipo Willey, obtendo-se 830 g de folhas verdes, 750 g de folhas secas, 560 g de raízes e 660 g sementes.

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS

O ponto de partida desse processo foi a extração exaustiva (Fluxograma 1) das diferentes frações da planta, a qual constou do emprego de solução hidroalcoólica (H₂O/EtOH) na proporção de 7:3, sendo que para cada quilograma de amostra seca foram utilizados 9,0 litros da solução. As diferentes partes da planta ficaram em infusão por dois dias, após o que foram filtradas, utilizando-se papel filtro encaixado em funil de plástico. Os extratos foram armazenados em erlenmeyers com capacidade de 5 L.



Fluxograma 1. Obtenção do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) das folhas caídas, folhas verdes, raízes e sementes de *Acacia mangium*.

Em seguida, procedeu-se a recuperação do etanol utilizando-se evaporador rotativo (EYELA – Tokyo Rikakikai) à temperatura de 50 °C. Após a retirada do álcool, os extratos foram preservados em geladeira. Os extratos foram então liofilizados em Freeze Dryer (Ikeda Scientific) eliminando-se toda a umidade, para posterior pesagem e preparo dos extratos para o bioensaio, o qual contou com a elaboração de solução hidroalcoólica 7:3 H₂O, de cada fração, a 1% (preservadas em geladeira).

4.4 ESPÉCIES RECEPTORAS

- *Mimosa pudica* (malícia),
- *Senna alata* (mata-pasto),
- *Pueraria phaseoloides* (puerária)

As sementes das plantas daninhas foram coletadas no campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental e as sementes da puerária foram adquiridas no mercado de Belém, PA. A quebra da dormência das sementes foi feita por imersão em ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos para malícia, e 20 minutos para as demais espécies (SOUZA FILHO et al., 1998a).

4.5 BIOENSAIO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES

As sementes das espécies receptoras foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, formato e coloração (LABOURIAU, 1983).

Os testes foram realizados na concentração de 1%, utilizando-se o material liofilizado, tendo como eluente álcool e água destilada na proporção de 7:3.

Foram adicionados 3 mililitros (mL) de solução de extrato bruto hidroalcoólico de cada uma das partes de *A. mangium* em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, forradas com uma folha de papel filtro esterilizado. Após a evaporação do álcool da solução, 25 sementes de cada espécie receptora foram distribuídas nas placas (Figura 8). As placas permaneceram em câmara de germinação (Eletrolab / 122 FC), com fotoperíodo de 12h e temperatura constante de 25°C. A germinação foi monitorada por período de dez dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas, considerando como ponto inicial a emissão de 2 mm da radícula. Com a finalidade de se evitar o ressecamento das placas e o crescimento de fungos no material em estudo, foi adicionado diariamente a cada placa, uma solução de nistatina na concentração de 2%.

O parâmetro avaliado foi o número de sementes germinadas a partir do qual foi calculado o percentual de inibição, com o intuito de se determinar qual fração da planta apresentou maior atividade inibitória.

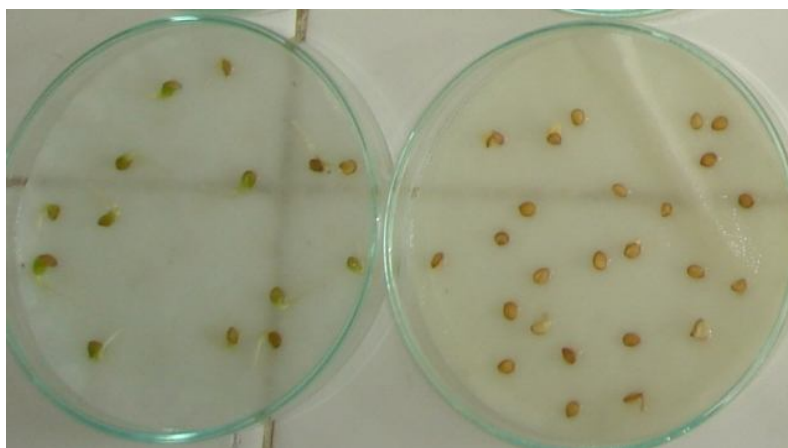


Figura 8. Germinação de sementes de *Mimosa pudica* (testemunha à esquerda e tratamento com extrato das raízes de *A. mangium* à direita).

As testemunhas, após germinadas, foram colocadas em caixas do tipo gerbox transparentes de 11 cm x 11 cm, juntamente com 50 sementes de cada espécie colocadas anteriormente também em caixas gerbox, forradas com papel filtro e solução

de nistatina na concentração de 2%, previamente separadas para posterior avaliação dos efeitos dos extratos sobre as espécies receptoras em pós-emergência.

4.6 BIOENSAIOS DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Quatro dias após a germinação das sementes nas caixas tipo gerbox forradas com papel filtro e umedecidas com solução de nistatina na concentração de 2%, três plântulas foram transferidas para placas de Petri também com papel filtro esterilizado e adicionados 3 mL de solução de cada um dos extratos. As plântulas foram selecionadas quanto à semelhança de comprimento do hipocótilo e radícula. As placas permaneceram em câmara de germinação (Eletrolab / 102 FC), com fotoperíodo de 24h e temperatura constante de 25°C. Com a finalidade de se evitar o ressecamento das placas e o crescimento de fungos no material em estudo, foi adicionado diariamente a cada placa, uma solução de água destilada com fungicida na concentração de 0,2%.

Após sete dias de crescimento, mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo para determinar a variação de desenvolvimento para posterior cálculo do potencial de inibição, a fim de se determinar qual parte da planta apresentou maior atividade inibitória.

Os extratos hidroalcoólicos das frações da espécie doadora foram testados tendo como testemunha a água destilada (sem extrato). Foi adicionada água destilada, contendo fungicida, às placas de Petri sempre que necessário para manter o ambiente úmido e adequado ao desenvolvimento das plântulas.

4.7 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

4.7.1 Coluna cromatográfica por via úmida

Após constatar-se que o extrato bruto das folhas secas da *A. mangium* foi o que apresentou os mais significativos valores em percentuais de inibição, principalmente na germinação, procedeu-se a etapa para o isolamento das substâncias. Para isso, preparou-se uma Coluna Cromatográfica por Via Úmida (CCVU) para separação das substâncias da fração folhas secas (Figura 9), a qual se processa por cromatografia de adsorção em coluna, usando a sílica gel como fase estacionária e solventes de polaridades crescentes como fase móvel, partindo-se do hexano, passando pelo acetato de etila e metanol em diferentes misturas de hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. Foram utilizadas 10 g de extrato bruto hidroalcoólico de folhas secas (EBHAFS), 150 g, de sílica para fase fixa da coluna, 20 g de sílica para compor a pastilha do extrato e um volume de 350 mL para cada sistema utilizado na fase móvel. O volume da coluna para os eluentes dos sistemas foi calculado usando-se $V = \pi.R^2.H.$, onde R é o raio da coluna e H é a altura da coluna de sílica.

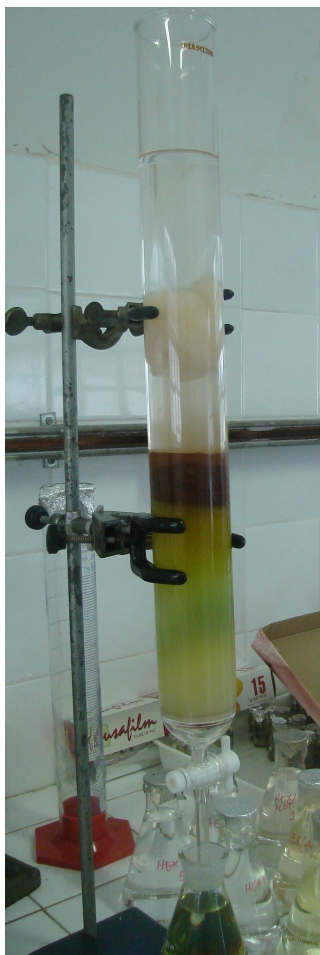


Figura 9. Coluna cromatográfica por via úmida com EBHA das Folhas secas.

Em seguida, as amostras foram coletadas em sistemas de eluentes com polaridade crescente, seguindo a seguinte ordem: hexano 100%; hexano/ AcOEt 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%; acetato 100%; acetato/metano 10% e 50%; metanol 100%. Ao todo foram 56 amostras coletadas com volumes aproximados de 100 ml cada.

4.7.2 Cromatografia em camada delgada

As amostras coletadas na CCVU foram concentradas por volatilização natural dos solventes. O conteúdo restante de cada amostra foi solubilizado com pequena quantidade de solvente (clorofórmio, acetato de etila ou metanol) e, com a ajuda de capilares de vidro, quantidades representativas das amostras foram aplicadas em placas cromatográficas de camada delgada (ALUMINUM BACKED TLC, SILICA GEL, HARD LAYER, F-254, SAI). A corrida da fase móvel foi realizada com misturas de solventes com polaridade crescente, correspondentes à amostra analisada. As cromatoplasmas foram reveladas através de irradiação com luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 nm em câmara escura e, após borrifação com uma solução de sulfato cérico 5%, foram submetidas a aquecimento em estufas de circulação de ar forçada a 100 °C. O padrão de separação de substâncias, de acordo com sua posição e coloração nas cromatoplasmas reveladas, foi desenhado.

4.7.2.1 Reunião das frações

As manchas observadas nas cromatoplasmas foram comparadas e aquelas considerados semelhantes foram reunidas, restando, após diversas reuniões, quatro amostras chamadas de R1' (hexano/ AcOEt 10 e 20%), R2,3'(hexano/ AcOEt 30, 40, 50 e 60% e acetato 100%), R4'(AcOEt /metanol 10 e 50%) e R5'(AcOEt /metanol 50% e metanol 100%).

4.7.3 Refracionamentos

Posteriormente foram realizadas novas colunas filtrantes, porém de menor diâmetro, para o refracionamento das amostras reunidas na fase anterior e separação mais eficiente das substâncias. Três das quatro frações finais foram refracionadas.

Fração R1' (Hexano/acetato \leq 20%) – em coluna com diâmetro de 1,9 cm, massa de 920 mg, 2 g de sílica para a pastilha, 10 g de sílica para a coluna e volume para os sistemas de eluentes da fase móvel igual a 25 ml.

Os sistemas de polaridade crescente utilizados foram: hexano 100%; hexano/AcOEt 2%, 5%, 7%, 10%, assim por diante, até 50%; AcOEt 100%; AcOEt /metanol 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; metanol 100%. O total de amostras coletadas foi de 87, as quais foram reunidas (após visualizadas em cromatografia de papel em camada delgada) em número de 27.

Fração R2,3' (Hexano/acetato \leq 100%) – em coluna com diâmetro de 1,9 cm, massa de 890mg, sílica para a pastilha (1,5 g), sílica para a coluna (9 g) e volume para os sistemas de eluentes da fase móvel igual a 20 ml.

Os sistemas de polaridade crescente utilizados foram: hexano 100%; hexano/acetato 2%, 5%, 7%, 10%, assim por diante, até 50%; acetato 100%; acetato/metanol 5%, 10%, até 50%; metanol 100%. O total de amostras coletadas foi de 93, as quais foram reunidas ficando em 38 amostras.

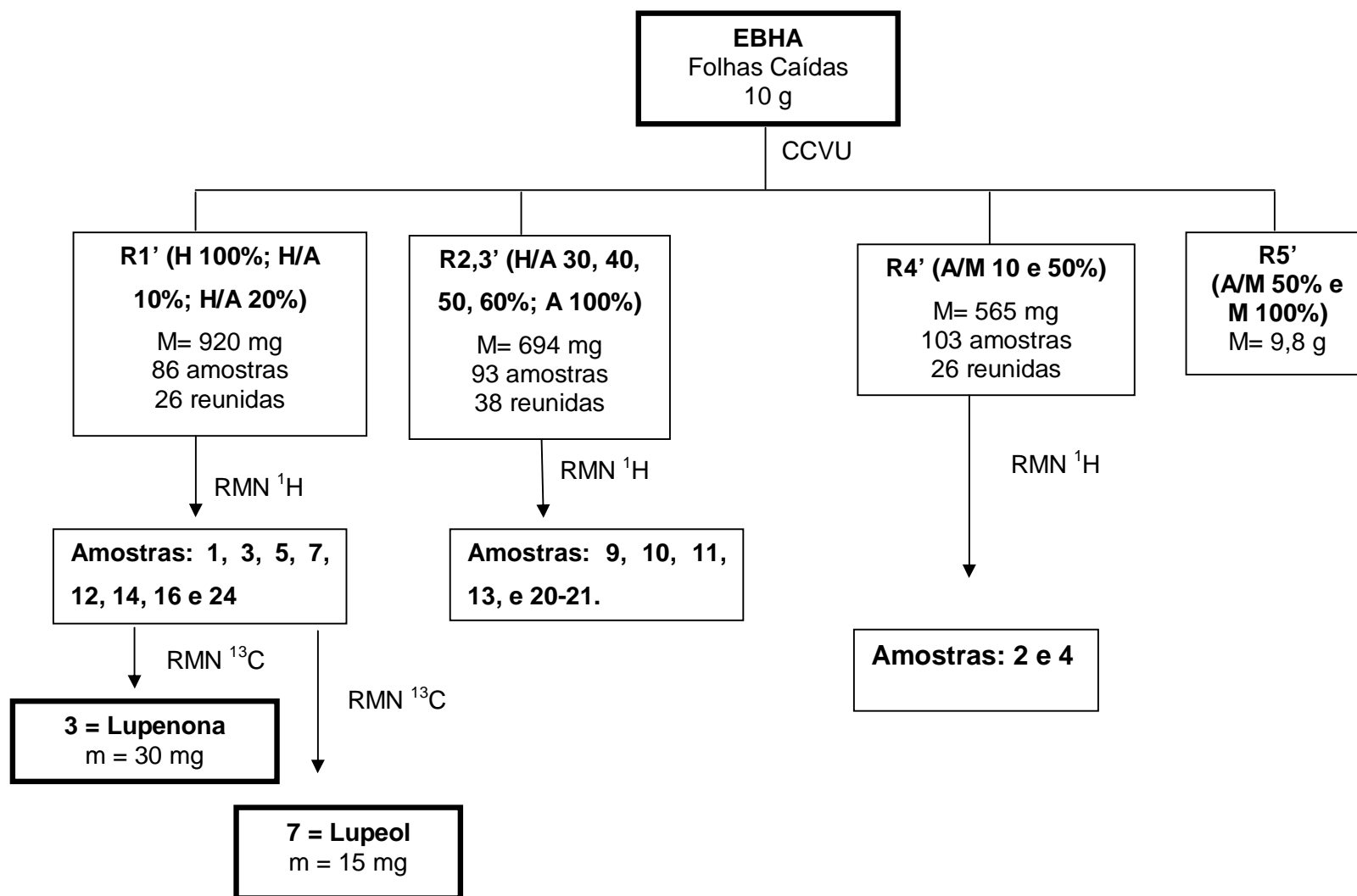
Fração R4' (Acetato/Metanol \leq 50%) – em coluna com diâmetro de 1,9 cm e massa de 565 mg. A quantidade de sílica calculada para a pastilha foi de 1,5 g e para a coluna, 6 g. A altura da coluna foi de 13,4 cm e o volume para os sistemas de eluentes da fase móvel foi igual a 40 ml.

Os sistemas de polaridade crescente utilizados foram: hexano 100%; hexano/acetato 2%, 5%, 10%, 15%, 17%, 20%, 22%, 25%, 30%, 32%, 35%, 37%, 40%, 42%, 45%, 50%; acetato 100%; acetato/metanol 2%, 5%, 7%, 10%, até 40%, 45%, 50%; metanol 100%. O total de amostras coletadas foi de 103, as quais foram reunidas (após visualizadas em cromatografia de papel em camada delgada) em numero de 25.

As frações de hexano 100% até hexano/acetato 15% foram descartadas, pois não havia massa.

4.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

No fluxograma a seguir (Fluxograma 2), é mostrado o procedimento de isolamento e purificação que possibilitou a identificação das substâncias lupeol e lupenona.



Fluxograma 2. Fracionamento e refracionamentos do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) das folhas caídas de *Acacia mangium*.

Após visualização das manchas nas cromatoplasmas, relativas às amostras obtidas das reuniões (R1'; R2,3' e R4'), que estão descritas no fluxograma acima, as que estavam em menor mistura foram enviados para análise de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H) no Laboratório de Química da Universidade Federal do Pará. Os espectros de ^1H mostraram que as mais viáveis para identificação foram as amostras 3 e 7. Estas foram submetidas a RMN ^{13}C , comparadas a dados da literatura (AHMAD e ATTA-UR-RAHMAN, 1994) e identificadas como Lupenona (3 β -Hidroxilup-20(29)-eno) e Lupeol (3-Oxolup-20(29)-eno).

4.9 ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS

A análise da atividade alelopática das substâncias foi realizada em dois experimentos distintos. No primeiro foram investigados os efeitos das substâncias isoladamente e em par sobre a germinação e desenvolvimento de radícula e hipocótilo das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), e no segundo experimento foi avaliada a interferência do pH da solução na atividade alelopática das substâncias apenas sobre a germinação das sementes das mesmas espécies do primeiro experimento. Em ambos os experimentos, as substâncias químicas foram testadas em concentração de 140 ppm, tendo como solvente o clorofórmio.

A germinação foi monitorada em período de dois dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (DURAN e TORTOSA, 1985).

Os bioensaios foram desenvolvidos em condições controladas: 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas para a germinação de sementes e 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 24 horas para o bioensaio de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo. No bioensaio de germinação de sementes,

cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel-filtro qualitativo, recebeu 25 sementes previamente tratadas para a quebra de dormência (SOUZA FILHO et al., 1998a). Nos bioensaios de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro forrada com uma folha de papel-filtro qualitativo, recebeu três sementes pré-germinadas, e no final de sete dias de crescimento mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo.

No experimento de avaliação dos efeitos de pH, foram preparadas soluções com pH 3,0 e 9,0, utilizando-se ácido clorídrico (HCl) para baixar o pH e hidróxido de potássio (KOH) para elevá-lo. As substâncias foram testadas na concentração de 140 ppm. Nesse caso, os efeitos foram analisados apenas sobre a germinação das sementes de malícia, pois não havia solução suficiente para outros testes. O bioensaio foi semelhante àqueles descritos para o primeiro experimento.

Em todos os bioensaios, cada placa de Petri recebeu 3,0 mL da solução-teste. As soluções foram adicionadas apenas uma vez, quando do início de cada bioensaio, sendo, a partir de então, adicionada apenas água destilada, sempre que necessário, para manter a concentração inicial. Especificamente para o bioensaio em que foram analisados os efeitos do pH, em vez de água destilada, adicionou-se solução aquosa de pH correspondente.

4.10 ANÁLISE POR HPLC PARA DETECÇÃO DE FLAVONÓIDES EM *Acacia mangium*

Como a principal classe de metabólitos secundários do gênero *Acacia* são os flavonóides (ANDRADE, 2003a), foi realizada análise em HPLC sobre três partes da *Acacia mangium* para a detecção dos flavonóides catequina e epicatequina.

Foi retirada uma amostra de 10 mg de cada extrato bruto hidroalcoólico das folhas verdes, sementes e raízes da *Acacia mangium*. Em seguida foi feita uma análise do perfil cromatográfico por HPLC, objetivando avaliar a complexidade dos extratos. Para a análise dos extratos foi realizado um pré-tratamento por meio de extração em

fase sólida, obedecendo as seguintes etapas: inicialmente, o cartucho Strata C18, 50 mg/1 mL (analítico), utilizado para reter os interferentes da amostra, principalmente clorofila. O cartucho foi condicionado passando-se 1 mL de MeOH, em seguida 1 mL de H₂O. Foram adicionados à amostra, 900 µL de MeOH e, para facilitar a solubilização da mesma, levou-se ao banho ultrassônico por 1 min. Em seguida foram adicionados 100 µL de água e novamente a amostra foi levada ao banho ultrassônico por mais 1 min. Essa solução foi transferida para o cartucho. Posteriormente, foi adicionado ao cartucho um volume de 1 mL de uma solução de MeOH:H₂O (9:1). A solução coletada foi colocada na capela para evaporar o solvente. Em seguida a massa residual foi ressuspensa em 1 mL de Acetonitrila (ACN) e procedeu-se a análise por HPLC.

O método de análise do perfil cromatográfico adotado foi o seguinte: coluna Gemini C18, 5 µ (150 x 4,6 mm), com fluxo de 1 mL/min.; com varredura de comprimento de onda entre 200 e 400 nm; lâmpada de deutério; volume da injeção foi de 20 µL; com variação de concentração de ACN de 5% a 100%, durante a tempo de 60 min.

Os equipamentos utilizados foram: cromatógrafo líquido - Shimadzu - constituído por uma bomba quaternária com quatro canais modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, degaseificador de membrana modelo DGU-20As, auto-injetor de amostras modelo SIL-20A, interface de comunicação modelo CBM-20A acoplado a microcomputador Pentium IV com software de integração LC solution; balança analítica Sartorius; ultra-som Branson 2200.

Os materiais usados foram: cartuchos Strata C18, 50 mg/1 mL da marca Phenomenex; colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e foi usada como fase estacionária a coluna: Gemini C18 10 µ (150 x 4,60 mm) e Gemini C18 10 µ (250 x 21,2 mm). Todos da marca Phenomenex. Para análise do perfil cromatográfico das amostras no HPLC analítico foi utilizada a acetonitrila grau HPLC (TEDIA), água purificada em um sistema de água Milipore Direct-Q[®] 3.

4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental para todos os bioensaios foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram analisados pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Na análise dos dados utilizou-se o programa SAS (SAS, 1989).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOENSAIO DE GERMINAÇÃO COM EBHA

A intensidade dos efeitos potencialmente alelopáticos variou em função tanto da espécie receptora quanto da fonte do extrato e do fator das plantas analisadas. Considerando-se os efeitos sobre a germinação de sementes (Tabela 1), o extrato bruto hidroalcoólico (EBHA) de folhas secas foi o que apresentou maior atividade alelopática sobre a espécie malícia (inibição de 99%), estando de acordo com Souza Filho *et al.* (2003), os quais observaram 90,5% de inibição na germinação desta mesma planta daninha, quando submetida ao extrato aquoso das folhas da leguminosa *Calopogonium mucunoides*. Mata-pasto foi a espécie de menor sensibilidade, com inibições abaixo de 12%.

Tabela 1 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de *Acacia mangium* sobre a germinação de sementes de plantas receptoras de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Extrato	Planta Receptora		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
Sementes	86,0Ba	5,0Cc	15,0Bb
Raízes	62,0Ca	15,0Ac	24,0Ab
Folhas Verdes	86,0Ba	8,0BCc	24,0Ab
Folhas Secas	99,0Aa	11,0Bc	4,0Cc

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

5.2 BIOENSAIO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Em relação ao desenvolvimento da radícula (Tabela 2), a intensidade das inibições observadas apresentaram pouca variação, com destaque para os efeitos do extrato de raízes sobre a espécie mata-pasto, com inibição da ordem de 55%, dado que discorda de Santos et al. (2007), que observaram que a inibição do extrato de raízes da leguminosa *Calopogonium mucunoides* sobre o desenvolvimento radicular da planta mata-pasto (*Senna obtusifolia*) foi de 14%.

Tabela 2 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de *Acacia mangium* sobre desenvolvimento da radícula de plantas receptoras de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Extrato	Planta Receptora		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
Sementes	31,0Ab	29,0Bb	38,0Aa
Raízes	27,0Bc	55,0Aa	35,0Ab
Folhas Verdes	29,0Aa	28,0Ba	20,0Bb
Folhas Secas	30,0Aa	28,0Ba	10,0Cb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Os efeitos verificados sobre o hipocótilo (Tabela 3) variaram mais em função das espécies receptoras do que da fonte de extrato. Malícia foi a espécie que evidenciou maior sensibilidade aos efeitos potencialmente alelopáticos, ficando a puerária como a de menor sensibilidade. Em experimentos utilizando malícia como planta receptora, esta, de modo geral, apresenta as maiores respostas em inibição de germinação e desenvolvimento (SANTOS et al., 2007; SOUZA FILHO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Tabela 3 – Efeitos inibitórios de extratos hidroalcoólicos de *Acacia mangium* sobre desenvolvimento do hipocótilo de plantas de áreas de pastagens. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Extrato	Planta Receptora		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
Sementes	51,0Aa	30,0Bb	2,4Ac
Raízes	53,0Aa	42,0Ab	2,2Ac
Folhas Verdes	50,0Aa	30,0Bb	1,0Ac
Folhas Secas	49,0Ba	33,0Bb	2,1Ac

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Comparativamente, para malícia, a germinação de sementes foi o fator de maior sensibilidade aos efeitos dos extratos, enquanto para puerária o desenvolvimento da radícula foi o fator mais intensamente inibido. Já para mata-pasto, o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foram mais intensamente inibidos.

Os resultados com extrato de folhas verdes foram muito semelhantes àqueles observados com extrato de folhas secas para a espécie receptora malícia, o que indica as folhas como importante fonte de substâncias com potencial alelopático-inibitório, com destaque para os efeitos sobre a germinação das sementes. Os resultados com extrato de raízes também foram bastante significativos para todos os parâmetros testados, mostrando que as folhas e as raízes são as fontes mais importantes de aleloquímicos (RODRIGUES et al., 1993; WESTON, 1996).

5.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS

Será apresenta a discussão dos dados espectrais das substâncias identificadas. Foram identificados os triterpenos lupenona e lupeol, cujas estruturas encontram-se a seguir:

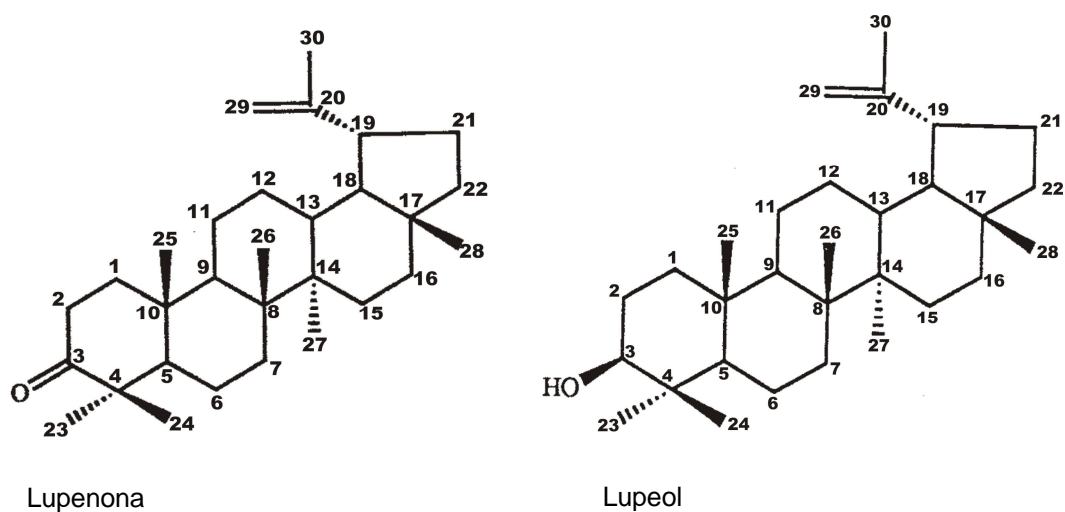


Figura 10. Estrutura química das substâncias Lupenona e Lupeol.

5.3.1 Lupenona

O espectro de RMN ^1H da lupenona (Figura 11) caracterizou-se pelo aparecimento de singletos largos entre 4,70 e 4,50 ppm, os quais são atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-29. Em 1,67 ppm encontrou-se um sinal atribuído aos hidrogênios H-30 (metila sobre dupla) e, entre 1,55 e 0,70 ppm, foram encontrados vários sinais atribuídos aos CH, CH₂ e CH₃. Esses dados estão de acordo com aqueles descritos na literatura para a lupenona (AHMAD e ATTA-UR-RAHMAN, 1994).

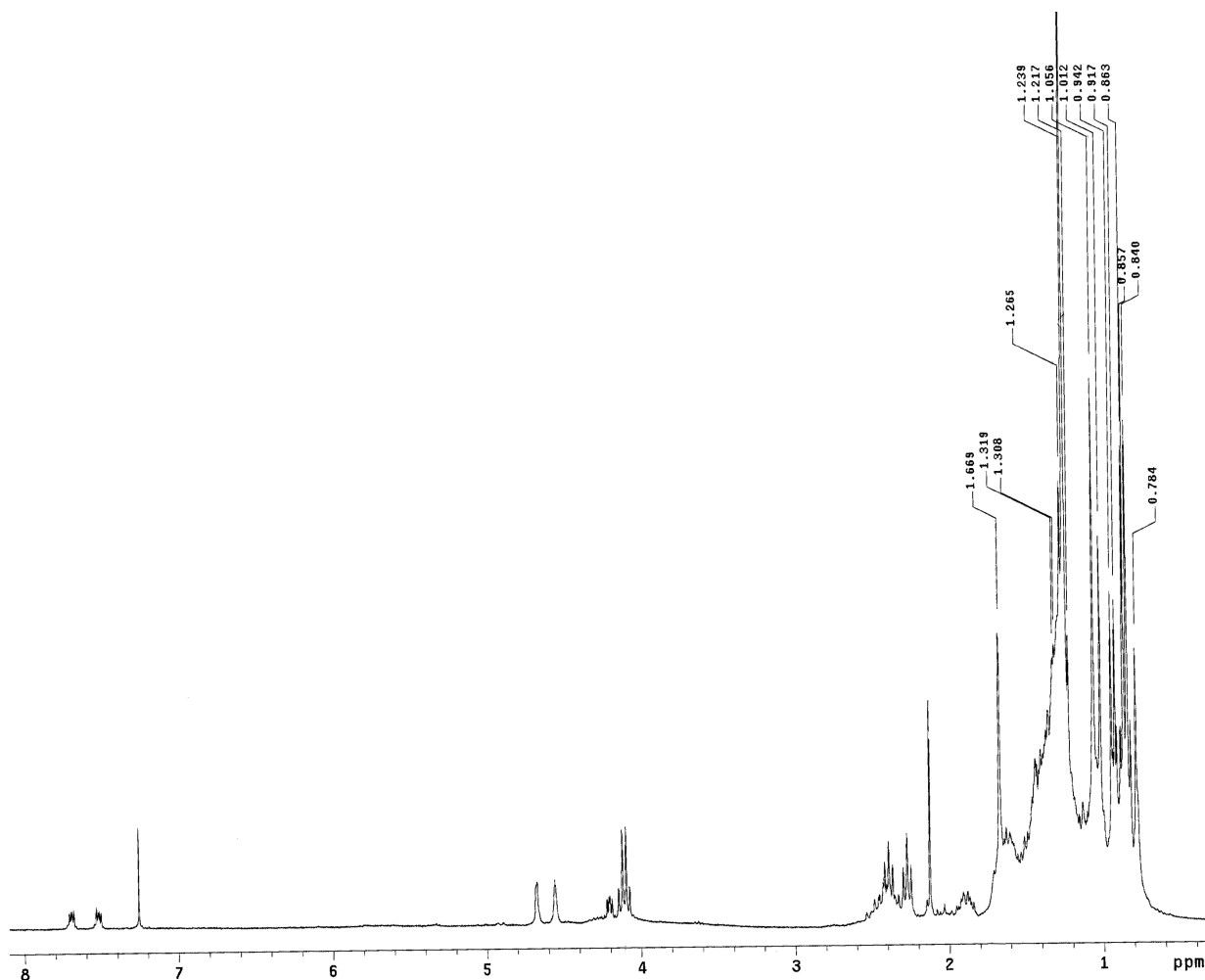


Figura 11. Espectro de RMN ^1H da substância lupenona (ppm, CDCl_3 , 300 MHz).

A identificação da lupenona foi confirmada com os dados de RMN ^{13}C e DEPT (Figuras 12 – 15, p. 66 e 67). Os dados de RMN ^{13}C da lupenona descritos na literatura foram incluídos na Tabela 4 (p. 72) para fins de comparação. Destacam-se nesse espectro os seguintes sinais:

- Em 150,8 e 109,3 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos C-20 e C-29, respectivamente.
- Sinais de carbono de sete grupos metílicos do esqueleto do triterpeno lupânico.

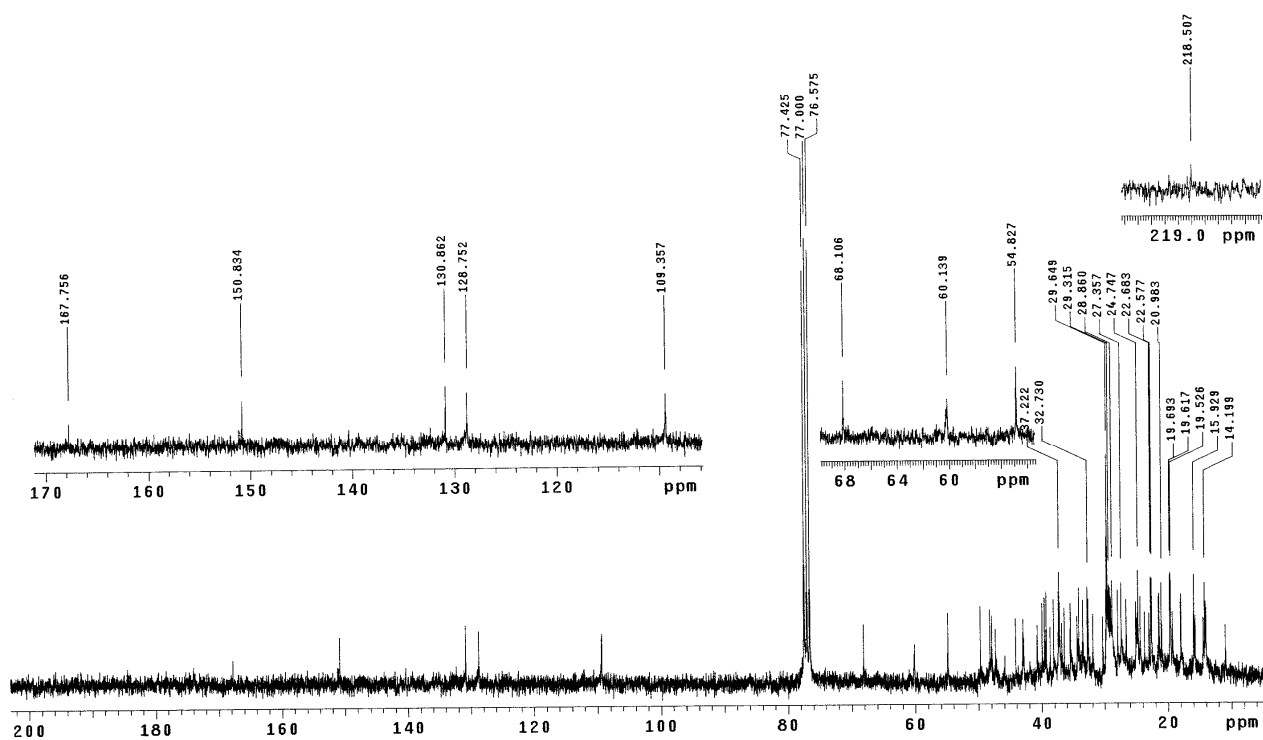


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C da lupenona (ppm, CDCl_3 , 75 MHz).

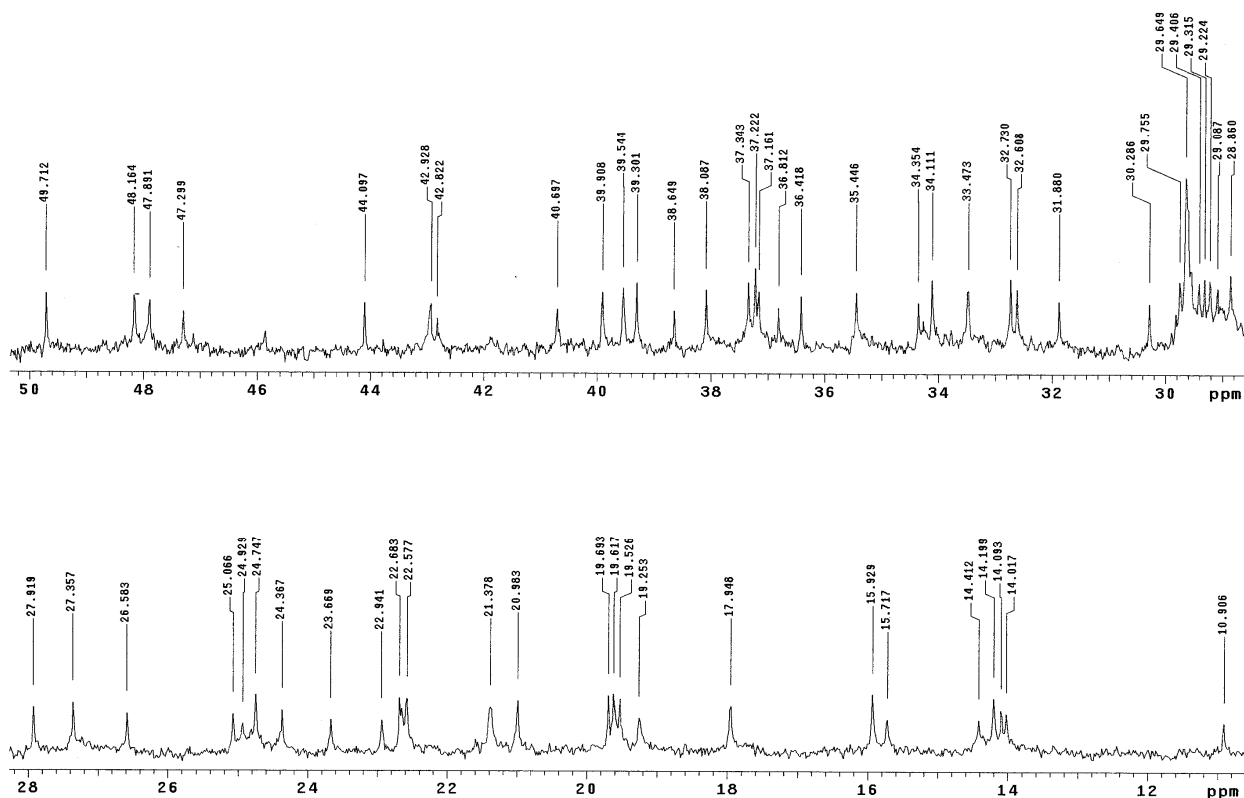


Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^{13}C da lupenona (ppm, CDCl_3 , 75 MHz).

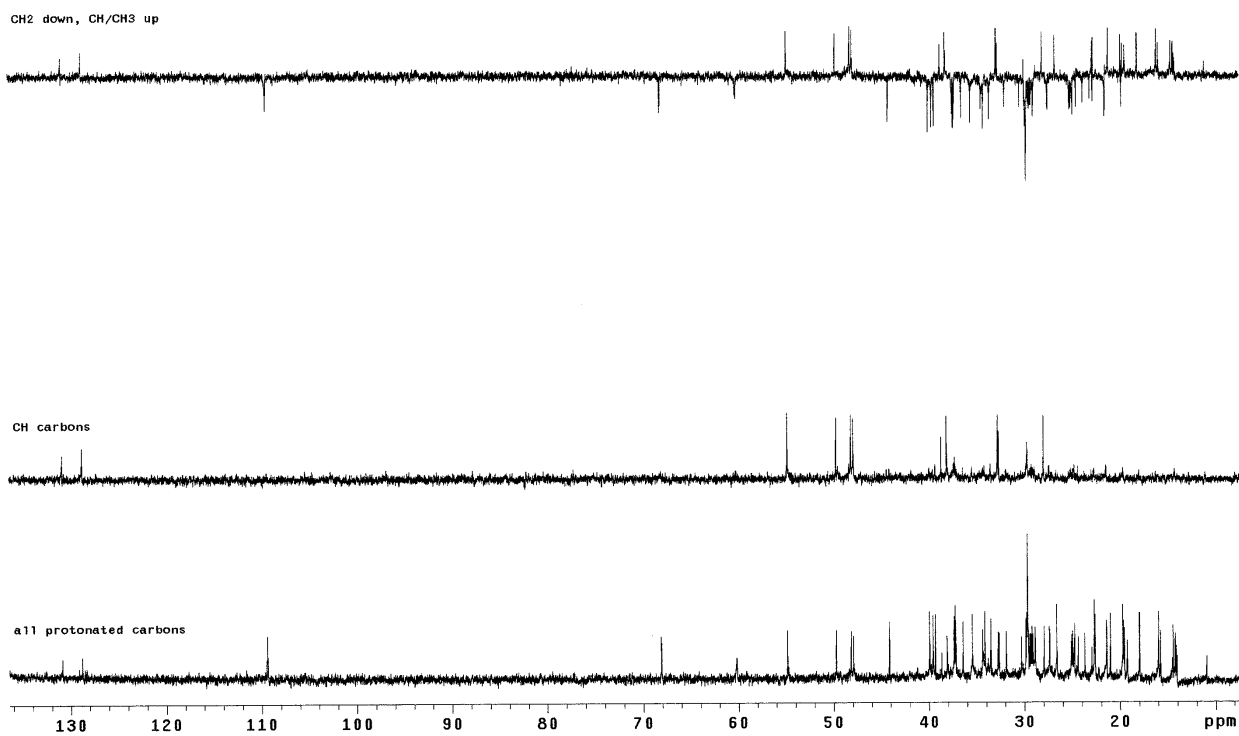


Figura 14. Espectro de DEPT da lupenona (ppm, CDCl₃).

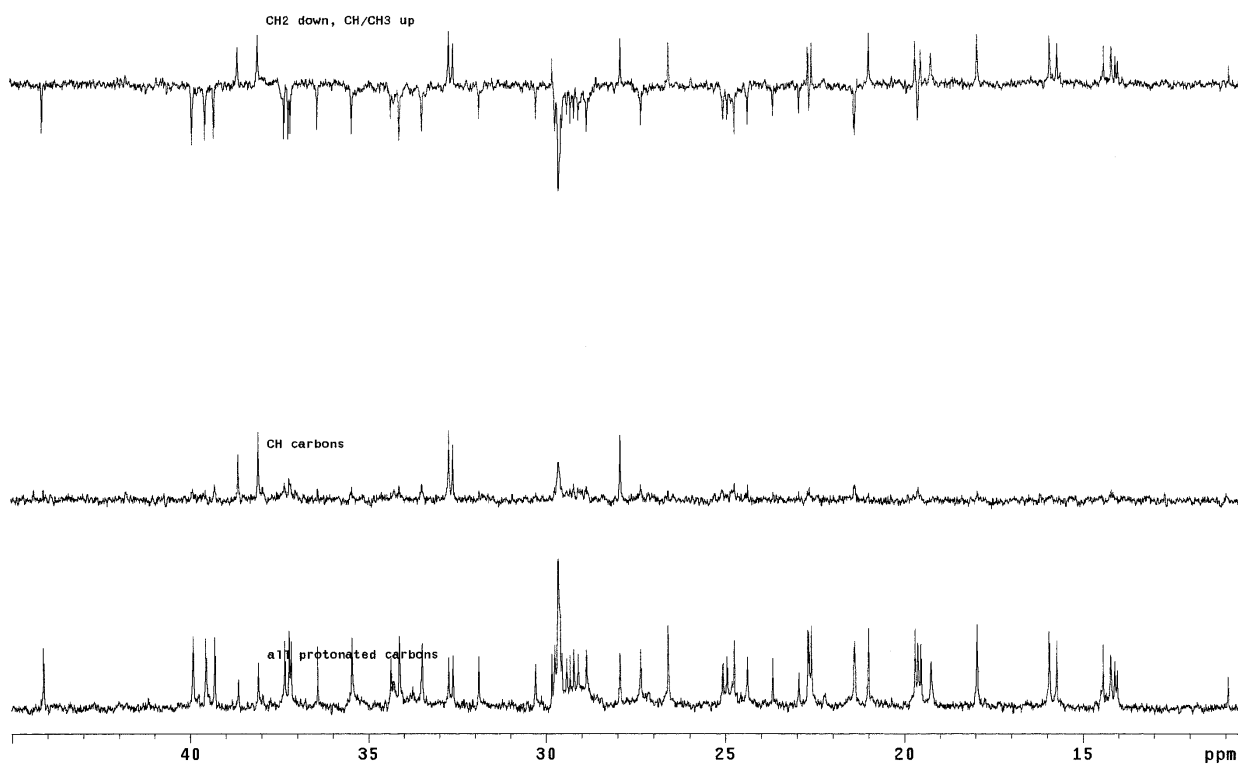


Figura 15. Expansão do espectro de DEPT da Lupenona (ppm, CDCl₃).

5.3.2 Lupeol

O espectro de RMN ^1H do lupeol (Figura 16, p. 68) caracterizou-se pelo aparecimento de singletos largos entre 4,70 e 4,50 ppm, os quais são atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-29. Em 1,67 ppm encontrou-se um sinal atribuído aos hidrogênios H-30 (metila sobre dupla). Entre 1,55 e 0,70 ppm, foram encontrados vários sinais atribuídos aos CH, CH₂ e CH₃.

Além desses esses sinais, muito semelhantes aos sinais encontrados no espectro da lupenona, pode ser observado um duplo duplete em 3,18 ppm (10,7 e 5,6 Hz), atribuído ao hidrogênio oximetínico H-3. Esses dados estão de acordo com os descritos na literatura para o lupeol (AHMAD e ATTA-UR-RAHMAN, 1994).

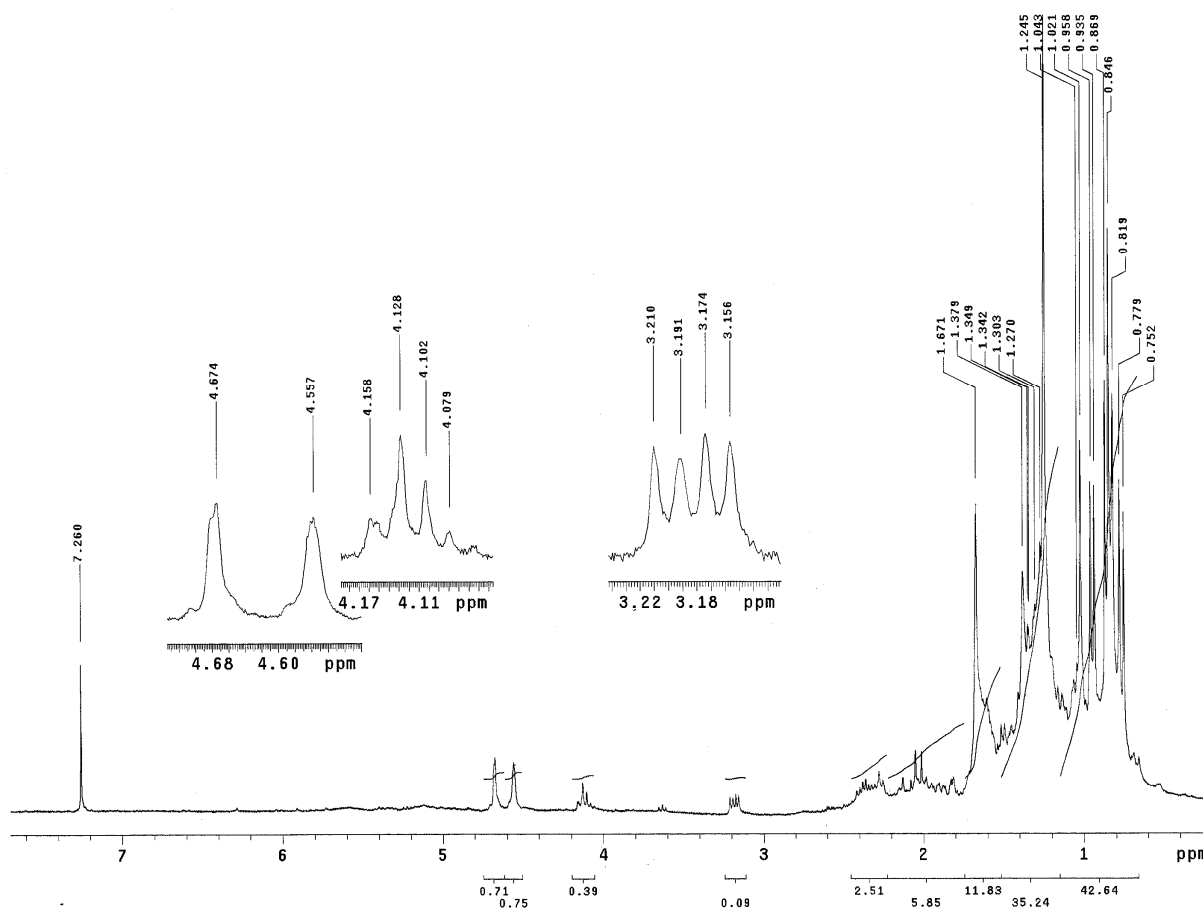


Figura 16. Espectro de RMN ^1H da substância lupeol (ppm, CDCl_3 , 300 MHz).

Os dados de RMN ^{13}C do lupeol (Figuras 16 – 20, p. 69 a 71) foram importantes na confirmação da identificação estrutural. Os dados de RMN ^{13}C do lupeol são encontrados na Tabela 4, juntamente com aqueles da literatura para essa substância. Nesse espectro, destacam-se os seguintes sinais:

- Um sinal 79,0 ppm atribuído ao carbono oximetínico C-3.
- Sinais em 150,9 e 109,3 atribuídos aos carbonos olefínicos C-20 e C-29, respectivamente.
- Os sinais atribuídos a sete grupos metílicos do lupeol.

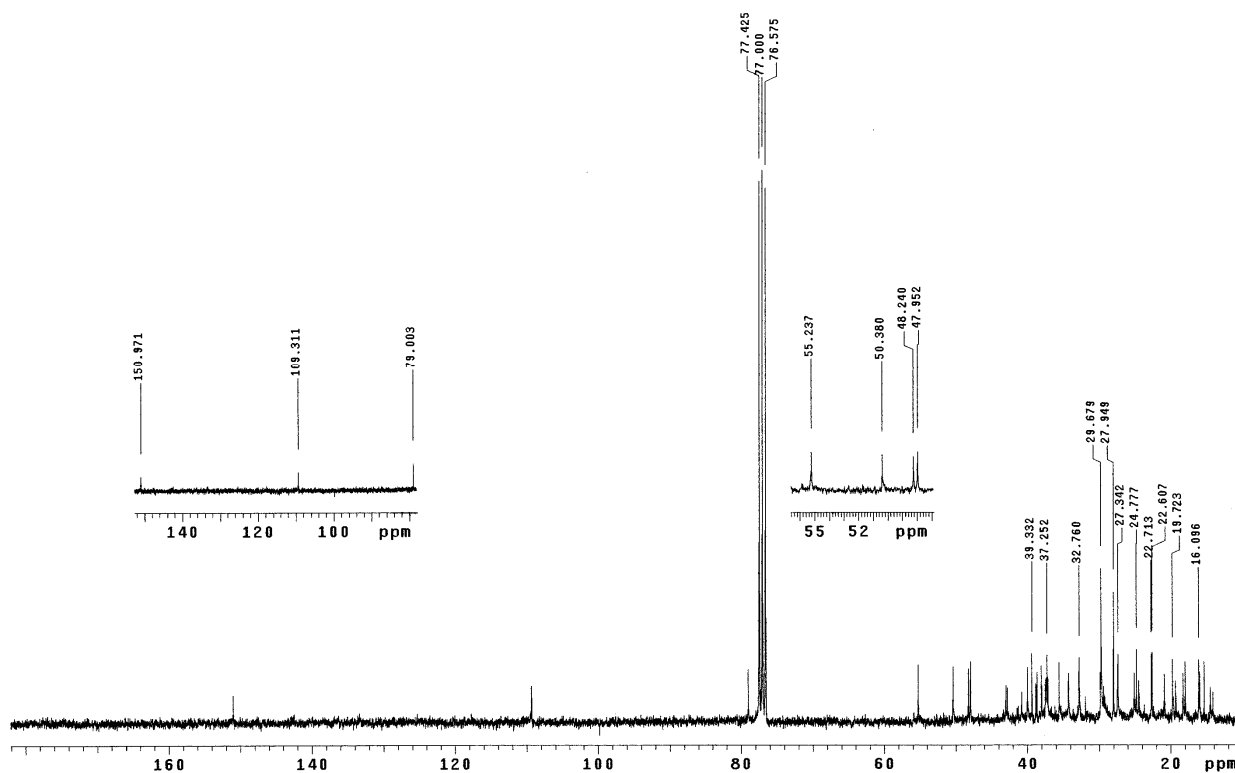


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C do lupeol (ppm, CDCl_3 , 75 MHz).

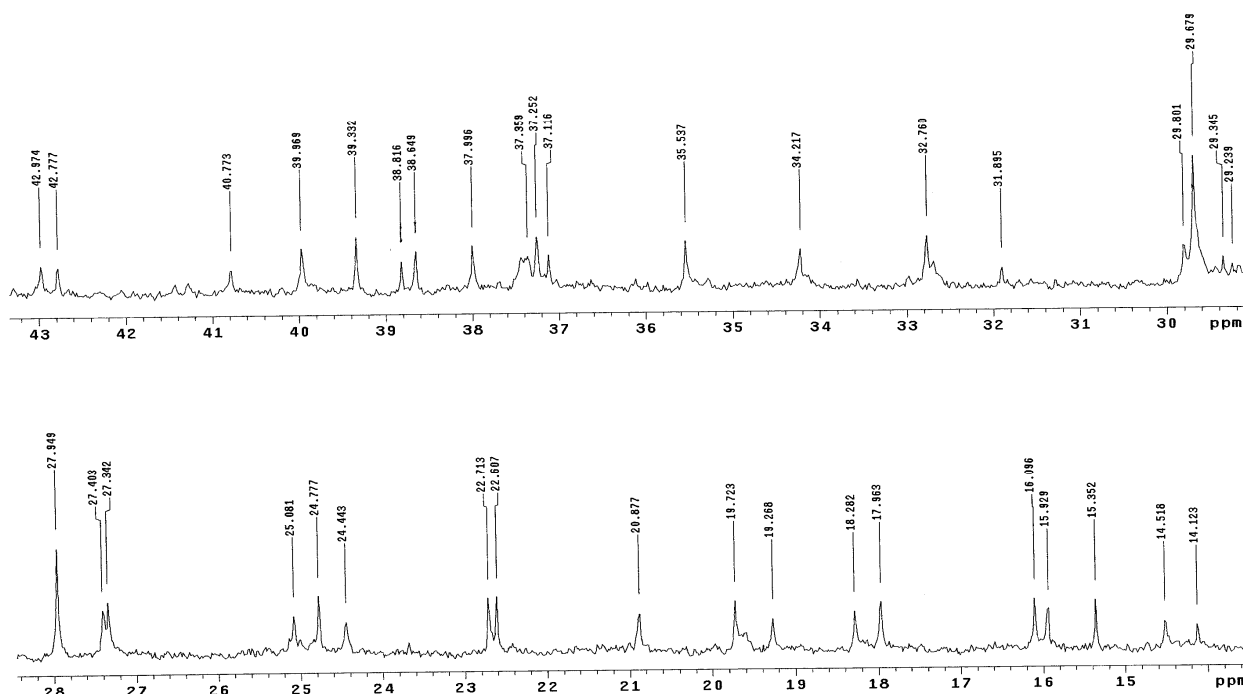


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C do lupeol (ppm, CDCl_3 , 75 MHz).

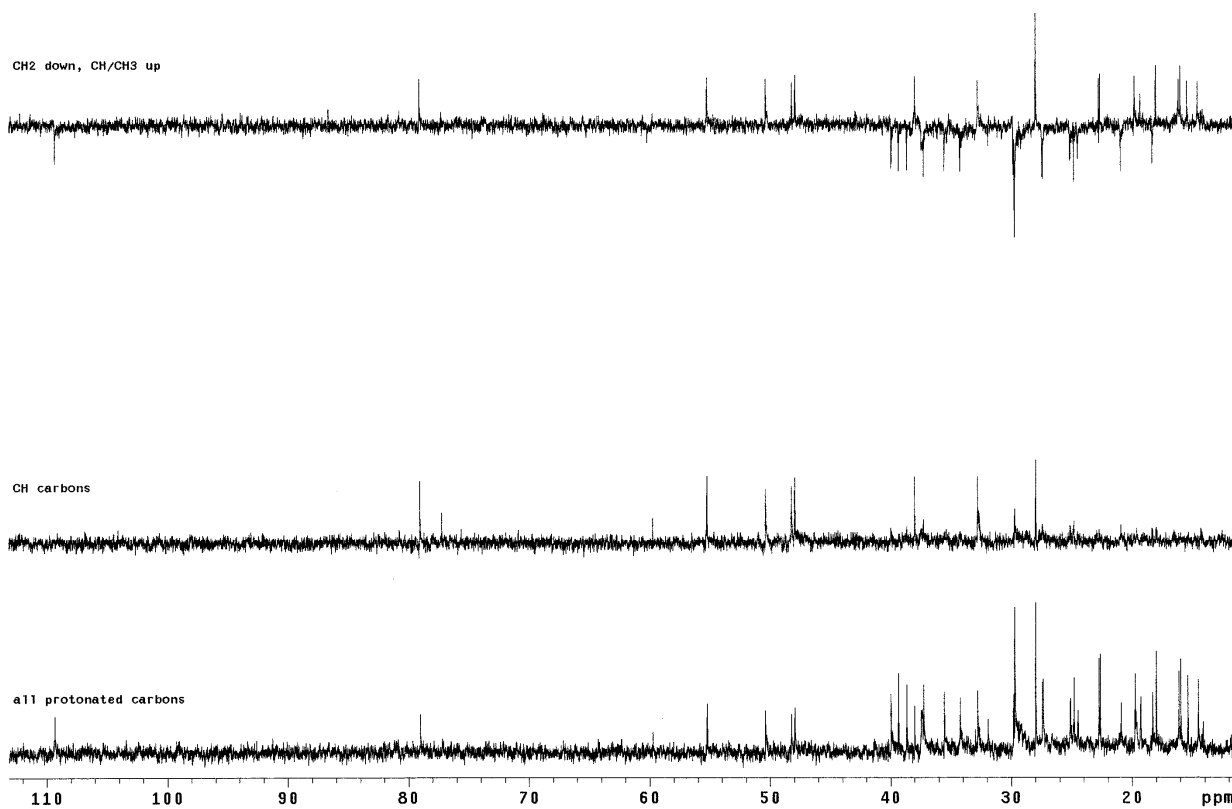


Figura 19. Espectro de DEPT do lupeol (ppm, CDCl_3 , 300 MHz).

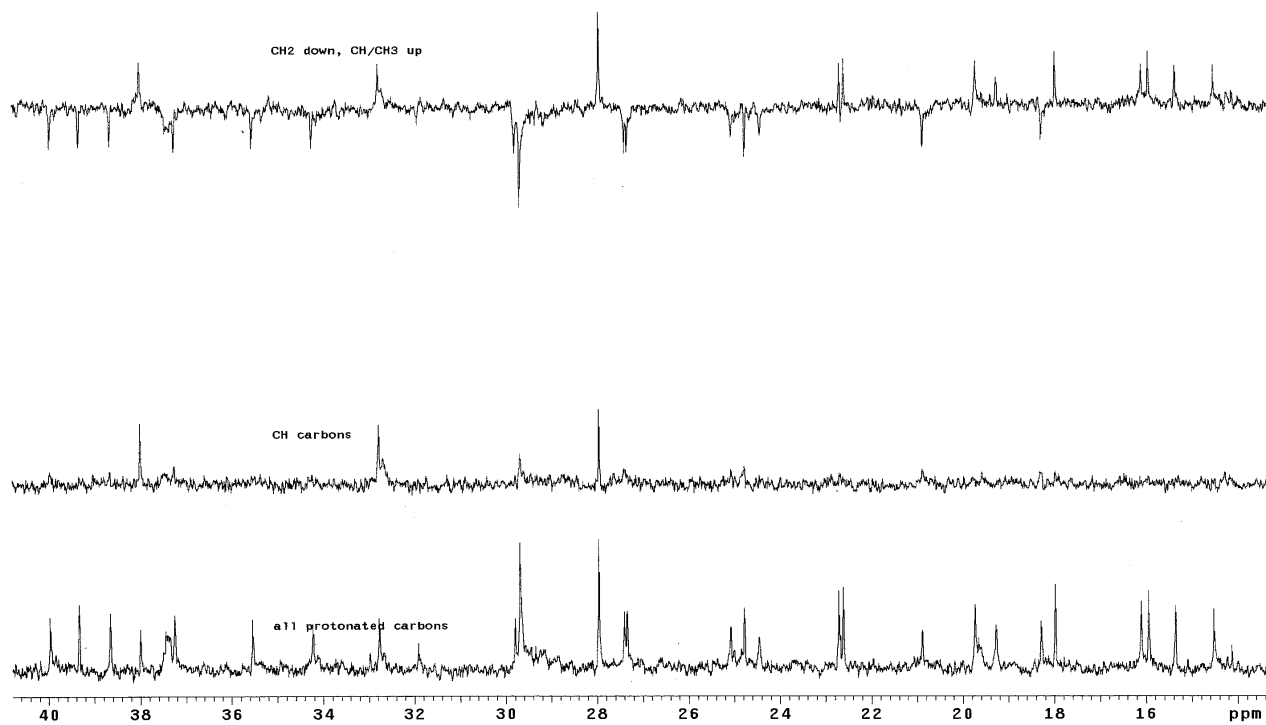


Figura 20. Expansão do espectro de DEPT do lupeol (ppm, CDCl_3 , 300 MHz).

Tabela 4 – Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3) da Lupenona e lupeol comparados com dados da literatura (AHMAD e ATTA-UR-RAHMAN, 1994).

Carbonos	Lupenona		Lupeol	
	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>
1	39,5	39,6	38,6	38,6
2	34,1	34,1	28,3	27,3
3	218,5	217,9	79,0	78,9
4	47,3	47,3	38,8	38,8
5	54,8	55,0	55,2	55,2
6	19,6	19,6	18,3	18,2
7	33,5	33,6	34,2	34,2
8	40,7	40,9	40,8	40,7
9	49,7	49,8	50,4	50,3
10	36,8	36,9	37,1	37,1
11	21,4	21,5	20,9	20,9
12	25,1	25,2	24,8	25,0
13	38,1	38,2	38,0	38,0
14	42,9	42,9	42,8	42,7
15	27,4	27,4	27,3	27,4
16	35,4	35,6	35,5	35,5
17	42,9	42,9	43,0	42,9
18	48,2	48,3	48,2	48,2
19	47,9	47,9	48	47,9
20	150,8	150,7	150,9	150,8
21	29,8	29,9	29,8	29,8
22	39,9	40,0	40,0	39,9
23	26,6	26,6	27,9	27,9
24	21,0	21,0	15,4	15,3
25	15,7	15,8	16,1	16,1
26	15,9	15,9	15,9	15,9
27	14,4	14,4	14,5	14,5
28	17,9	18,0	18,0	17,9
29	109,3	109,2	109,3	109,3
30	19,3	19,3	19,3	19,2

5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.4.1 Efeito alelopático das substâncias

Na concentração testada das substâncias, de 140 ppm, os efeitos promovidos pelas substâncias lupenona e lupeol, sobre a germinação das sementes de mata-pasto e malícia, não diferiram ($p > 0,05$) entre si, ou seja, não foi observado qualquer efeito das substâncias sobre a germinação das sementes. Estas substâncias testadas em par também não mostraram efeito inibitório ou estimulatório sobre a germinação das sementes (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona e Lupeol, isoladas e em par, sobre a germinação de sementes duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha - água destilada.

Planta receptora	Substância		
	Lupenona	Lupeol	Lupenona+Lupeol
Malícia	2,3	1,0	2,3
Mata-pasto	1,0	1,0	1,0

Sabe-se que os monoterpenos e sesquiterpenos são os terpenóides mais envolvidos em alelopátia (ABRAHIM et AL., 2000) e, embora muitos estudos relacionem triterpenóides com fortes atividades alelopáticas (FISCHER et al., 1994; FISCHER, 1986 e LOTINA-HENSEN et al., 1992), outros apresentam essa classe de compostos com pouca atividade inibitória e, em certos casos, com atividade estimulatória.

Macías, Simonet e Galindo (1997), isolaram 11 triterpenos de frações bioativas da parte aérea de *Melilotus messanensis*, e à semelhança das respostas encontradas neste trabalho, o efeito global dos triterpenos sobre *Lactuca sativa* nos parâmetros germinação e desenvolvimento inicial foi abaixo de 10% de inibição.

Santos et al. (2008), observaram baixa atividade alelopática de dois triterpenos pentacíclicos (fridelina e epifridelinol) sobre germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas das espécies malícia e mata-pasto.

Há exemplos onde as misturas das substâncias são muito mais ativas do que os compostos simples (MACIAS, SIMONET E GALINDO, 1997), porém, quanto ao

desenvolvimento da radícula (Tabela 6) – embora este parâmetro tenha se mostrado mais sensível do que os demais, com inibições acima de 30% - foi observado antagonismo entre as substâncias, pois as inibições com as substâncias isoladas foram mais elevadas do que com elas em par.

Tabela 6 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona e Lupeol, isoladas e em par, sobre o desenvolvimento da radícula de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha - água destilada.

Planta receptora	Substância		
	Lupenona	Lupeol	Lupenona+Lupeol
Malícia	42,8 ± 3,6	36,4 ± 4,5	27,4 ± 1,8
Mata-pasto	42,7 ± 9,3	41,3 ± 6,5	35,5 ± 2,9

Com relação ao desenvolvimento do hipocótilo (Tabela 7), não houve expressiva inibição das substâncias, nem diferença significativa entre a ação das substâncias isoladas e em par, ficando os valores em torno de 15%, sendo semelhantes aos resultados encontrados por Lôbo et al. (2008), os quais testaram a ação inibitória de do triterpenóide pentacíclico epicatequina, na concentração de 15 mg/L, e obtiveram percentual de inibição sobre a malícia inferior a 20%.

Tabela 7 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona e Lupeol, isoladas e em par, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Planta receptora	Substância		
	Lupenona	Lupeol	Lupenona+Lupeol
Malícia	16,7 ± 0,9	16,6 ± 1,3	15,6 ± 0,9
Mata-pasto	17,3 ± 9,1	15,5 ± 5,5	12,3 ± 6,1

5.4.2 Efeito do pH na atividade alelopática das substâncias

Houve interação para os fatores pH e germinação pela análise de variância (teste F) e o desdobramento da interação é apresentado na Tabela 8. Os dados mostram efeitos expressivos do pH na atividade das duas substâncias, com variações para

ambas. Individualmente, lupenona apresentou maior atividade alelopática em condições ácidas (Ph = 3,0), enquanto lupeol apresentou maior atividade em condições alcalinas (pH = 9,0). Para a análise comparativa entre as duas substâncias, o pH não se mostrou fator determinante. Quando se analisa as variações dentro de cada pH, observa-se que em condições ácidas, lupenona, isoladamente ou em associação com lupeol, apresenta atividade alelopática inibitória superior à lupeol, enquanto com pH alcalino, lupeol isoladamente ou em par com lupenona é superior à lupenona. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos et al. (2008), em trabalho envolvendo o estudo com os triterpenóides fridelina e epifridelinol, no qual a primeira substância, em pH 9,0, se mostrou mais ativa isoladamente e em par do que a segunda isoladamente.

Aparentemente, em condições de solos ácidos, como são os casos dos solos tropicais da Amazônia, especialmente, a tendência é de que lupenona apresente melhor desempenho em termos de alelopatia inibitória e para solos alcalinos, os efeitos alelopáticos inibitórios de lupeol sejam beneficiados.

As pesquisas envolvendo os efeitos do pH na atividade alelopática de dada substância isoladamente ou em associação com outra é extremamente limitado. Ao estudarem germinação de sementes sob os efeitos de variações do pH, Batra e Kuma (1993) observaram que o pH influencia a germinação em condições extremamente ácidas ou alcalinas. Souza Filho et al. (1998b, 2001), em função do pH na faixa de 3,0 e 11,0, não encontraram variações na germinação das sementes.

Esses dados permitem supor que as variações observadas na atividade alelopática das substâncias lupeol e lupenona está associada a alguma especificidade em relação ao pH.

Tabela 8 – Efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias Lupenona e Lupeol, isoladas e em par, sobre a germinação da planta daninha malícia, em função do pH da solução. Dados expressos em percentual de germinação.

pH	Substância		
	Lupenona	Lupeol	Lupenona+Lupeol
pH 3	68,0 ± 0,0 Bb	74,7 ± 0,0 Aa	68,9 ± 0,0 Aa
pH 9	78,5 ± 0,0 Aa	68,0 ± 0,0 Bb	68,0 ± 0,0 Ab

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

5.5 ANÁLISE POR HPLC PARA DETECÇÃO FLAVONÓIDES EM *Acacia mangium*

Após a obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos das partes da *Acacia mangium*, folhas verdes, raízes e sementes (Figuras 21, 22 e 23, respectivamente – p. 76 e 77), estes foram comparados com o perfil dos padrões das substâncias catequina (C1) e epicatequina (C2) (Figura 24, p. 78). A análise comparativa foi feita observando os tempos de retenção e os espectros de ultravioleta dos picos dos padrões da catequina e da epicatequina como os picos dos extratos folhas verdes, raízes e sementes.

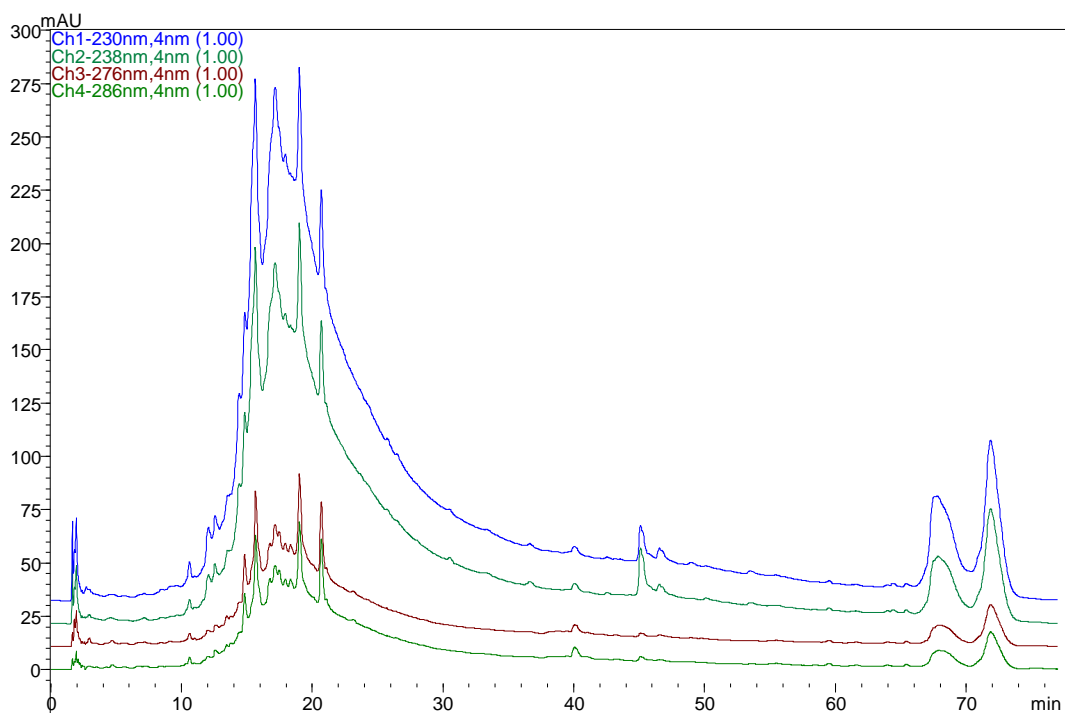


Figura 21. Cromatograma do extrato hidroalcolico das folhas verdes.

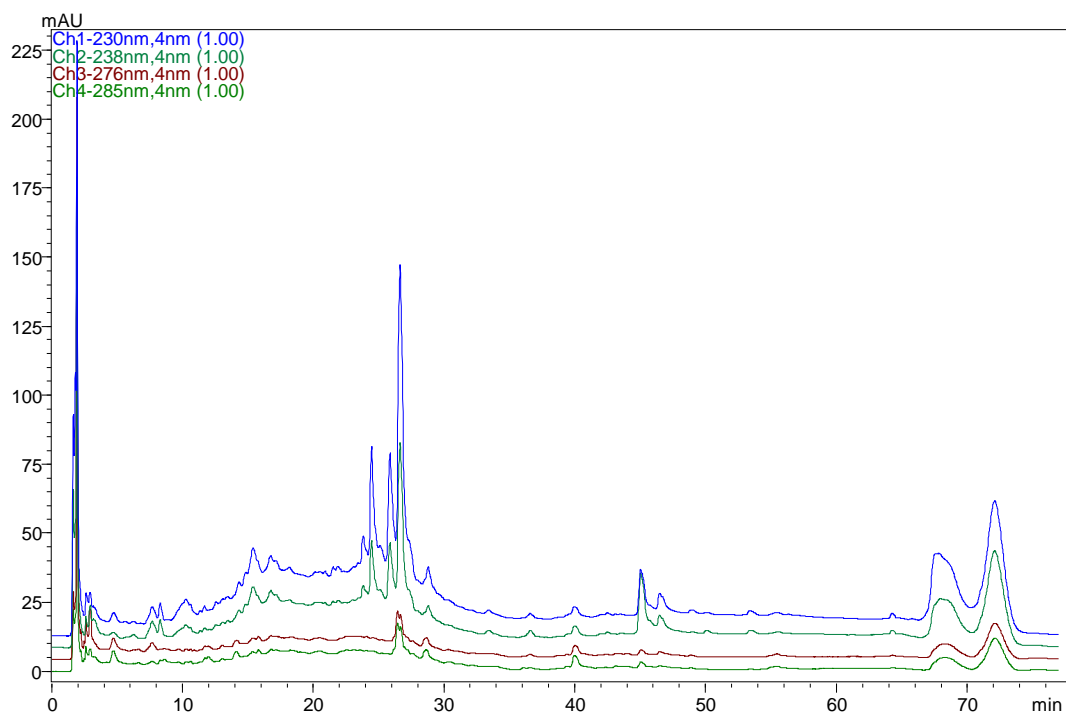


Figura 22. Cromatograma do extrato hidroalcolico das raizes.

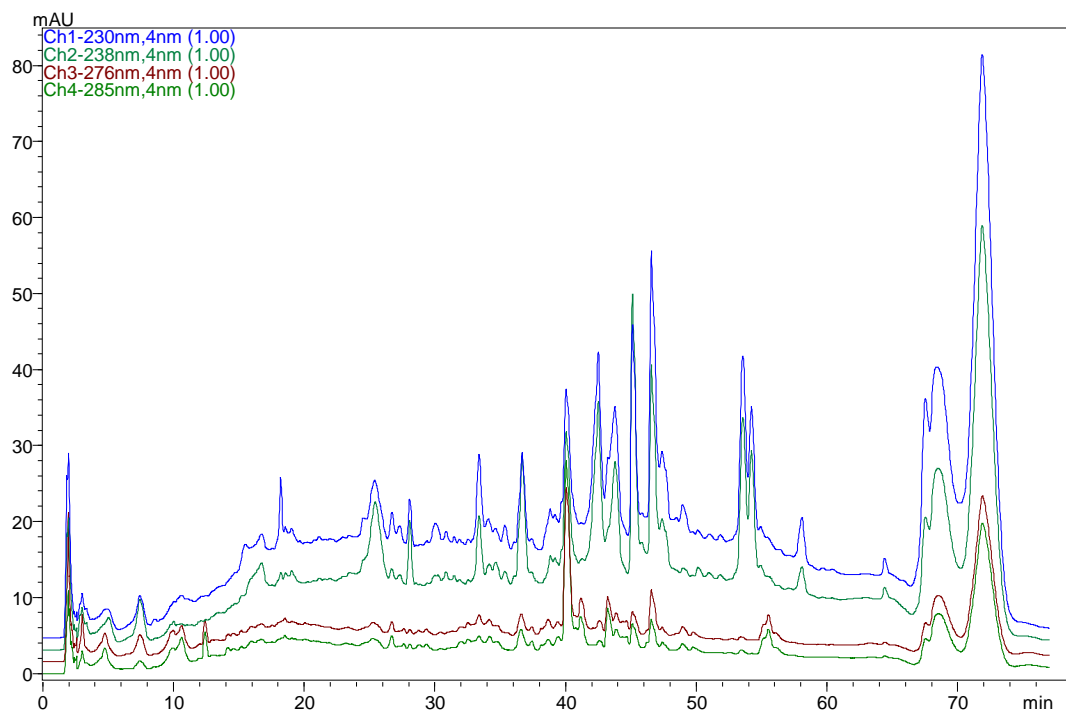


Figura 23. Cromatograma do extrato hidroalcolico das sementes.

Os comprimentos de onda do espectro de ultravioleta foram escolhidos baseados nos máximos de absorção das substâncias padrão. Os comprimentos de onda foram: 230 nm e 276 nm (C1); 238 nm e 286 nm (C2) como mostrados nas figuras 25 e 26, p. 78 e 79.

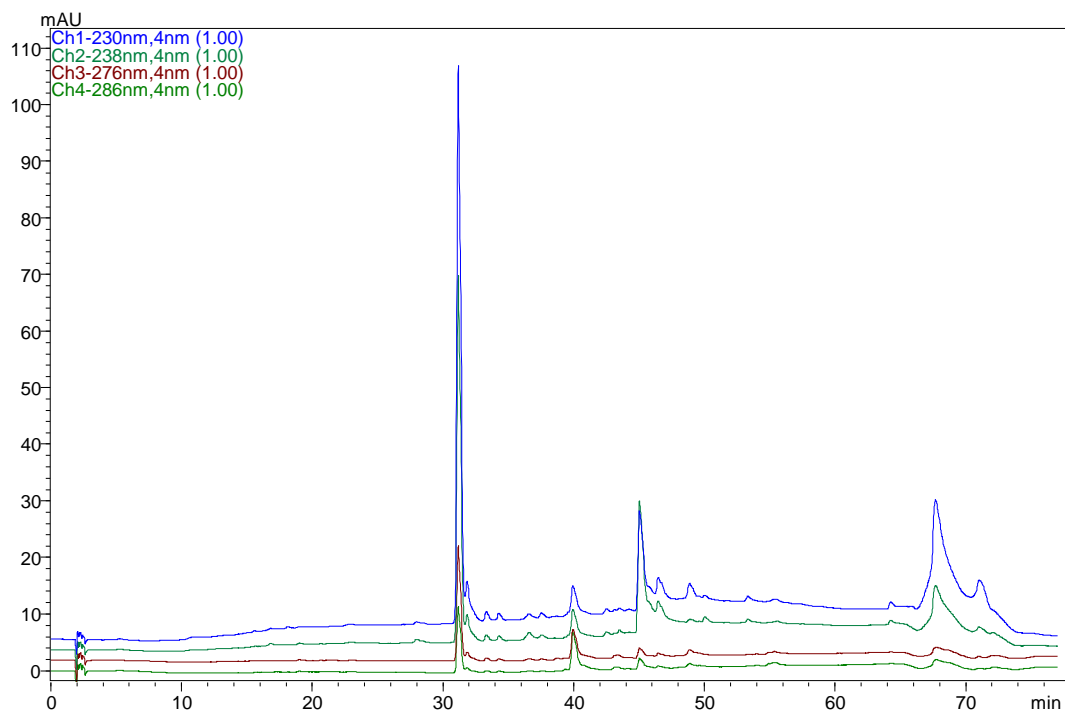


Figura 24. Cromatograma dos padrões de C1 e C2.

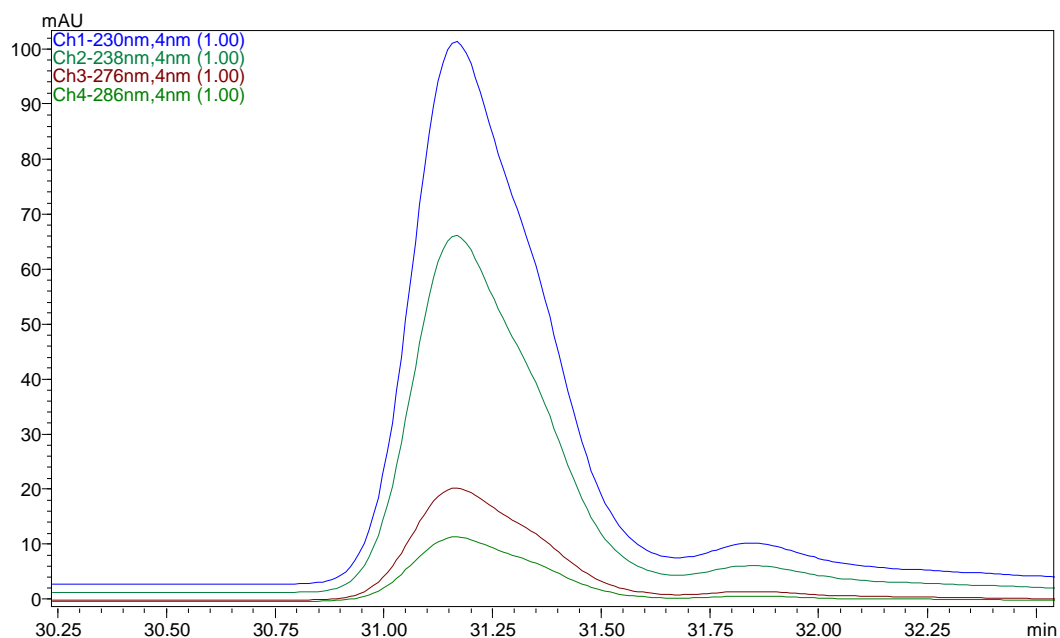


Figura 25. Expansão do Cromatograma do pico de C1.

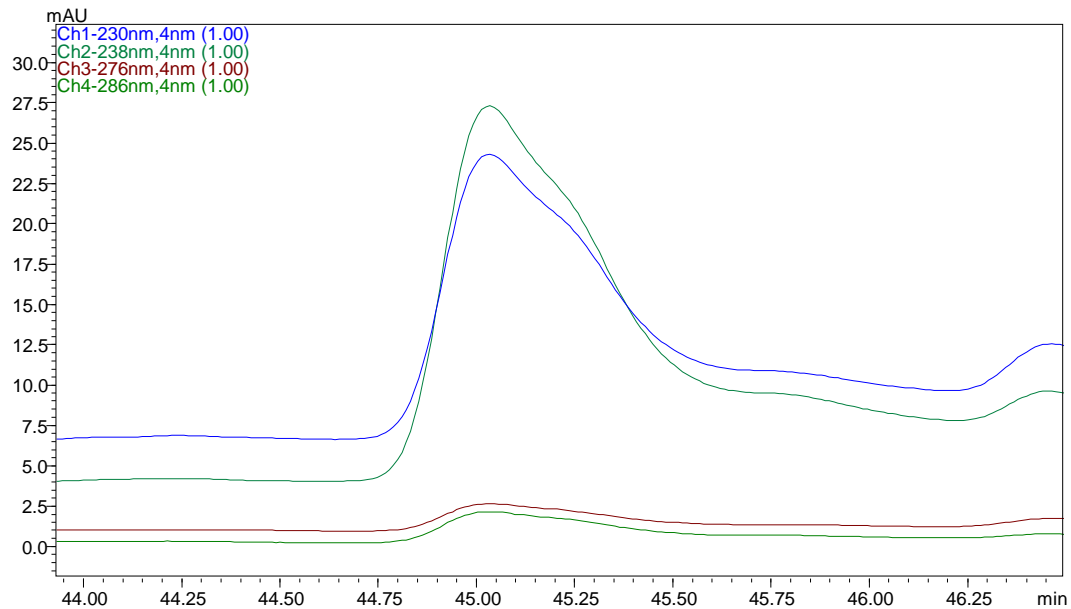


Figura 26. Expansão do Cromatograma do pico de C2.

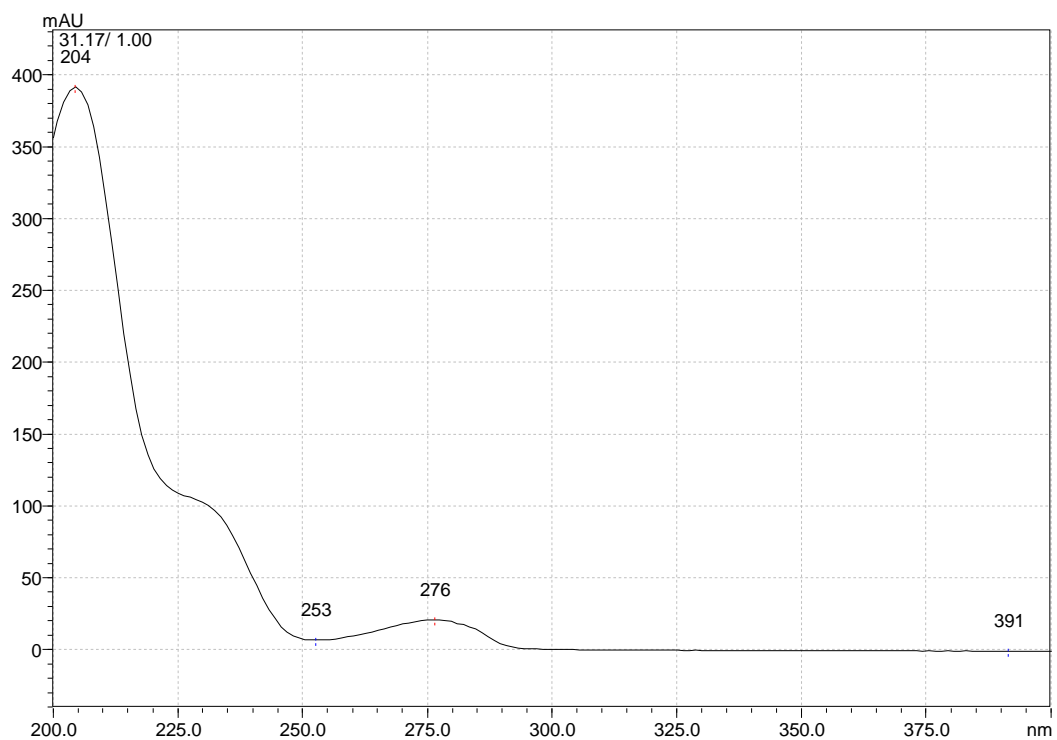


Figura 27. Espectro de ultravioleta do pico da substância C1 no $T_r = 31,17$ min.

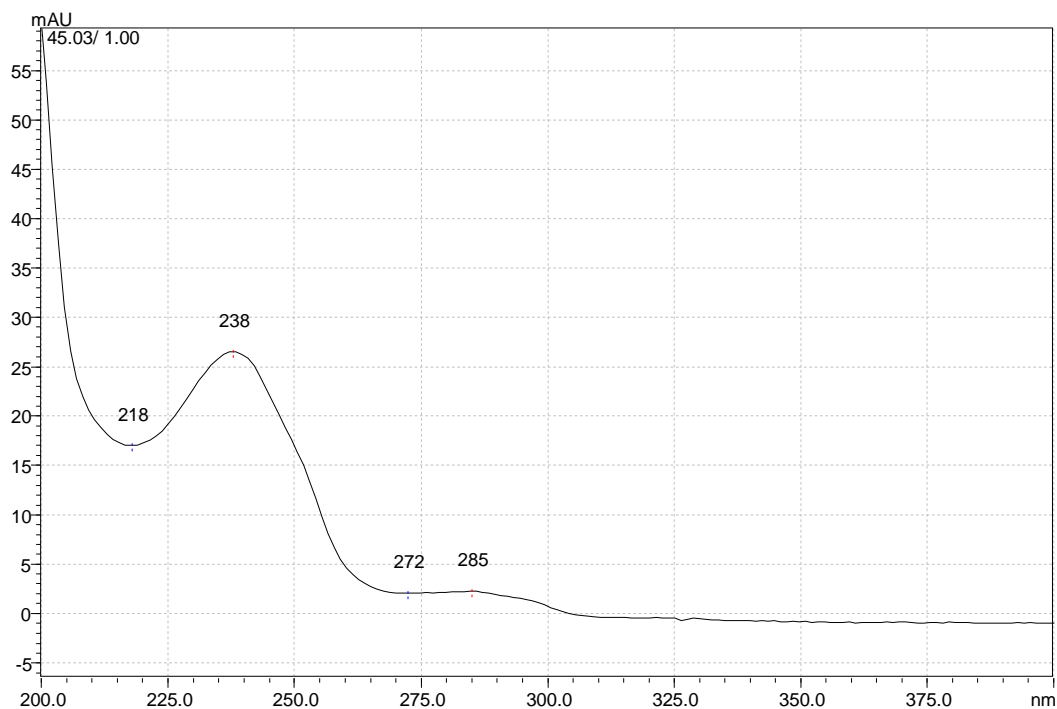


Figura 28. Espectro de ultravioleta do pico da substância C2 no $T_r = 45,11$ min.

No pico de tempo de retenção $T_r = 45.09$ min. (Figura 29, p. 81) do cromatograma das folhas verdes, observou-se no espectro de ultra-violeta os máximos de absorção em 235 e 285 nm (Figura 30, p. 81), que assemelham-se com os máximos de absorção 238 e 285 nm (Figura 26, p. 79) de C2 no tempo de retenção $T_r = 45.11$ min. (Figura. 28, p. 80).

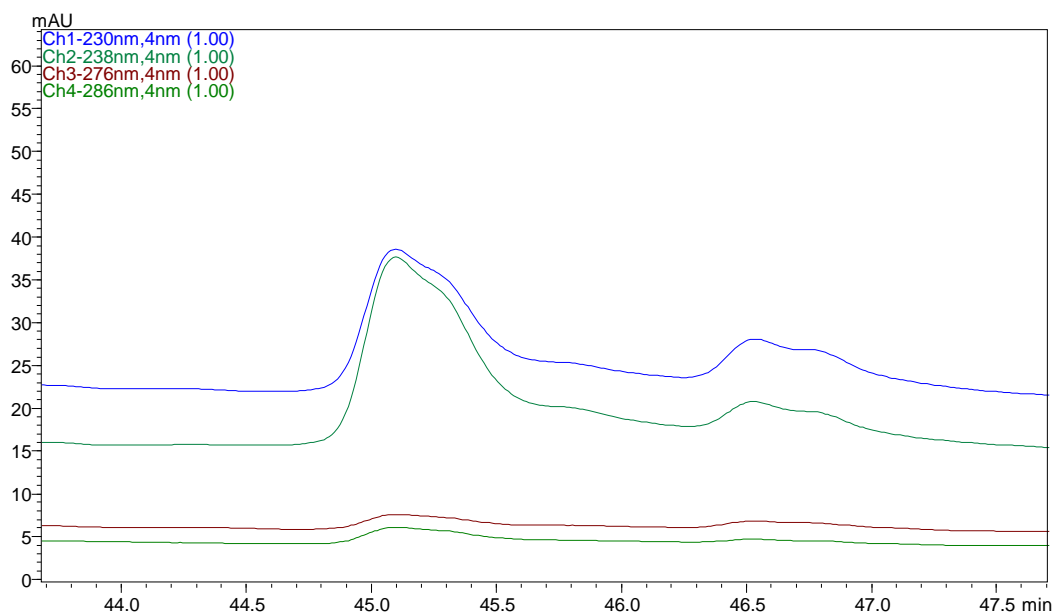


Figura 29. Expansão do cromatograma do extrato hidroalcoólico folhas verdes.

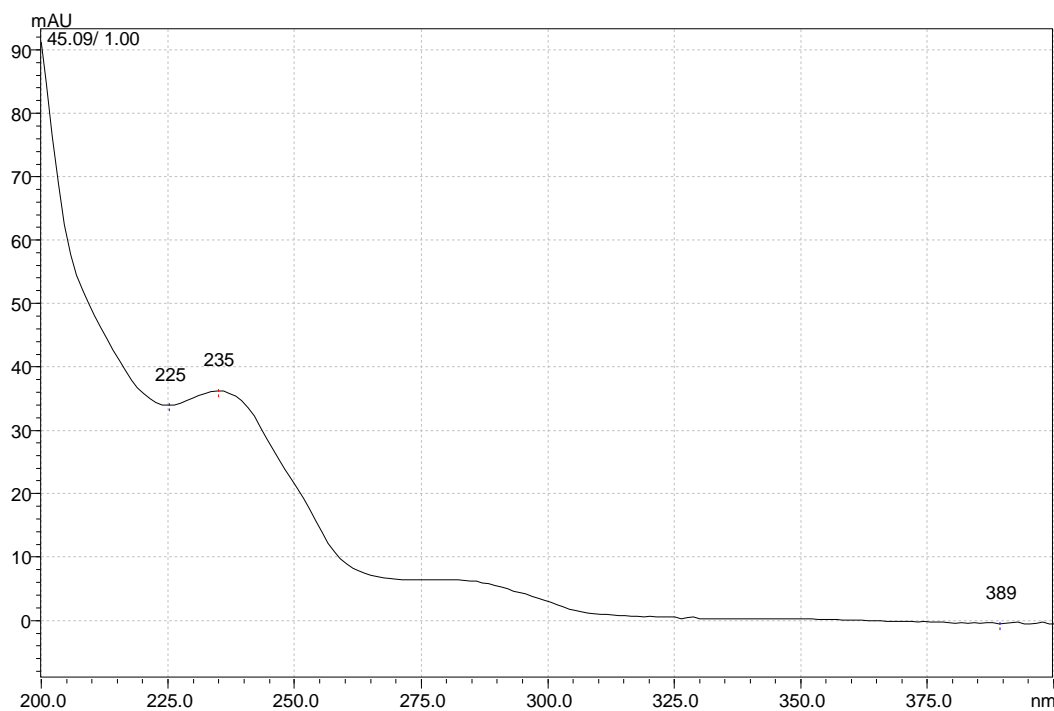


Figura 30. Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,09$ min do extrato hidroalcoólico das folhas verdes.

No pico de tempo de retenção $T_r = 45,03$ min. (Figura 31, p. 82) do cromatograma das raízes, observou-se no espectro de ultra-violeta os máximos de absorção em 237 e 285 nm (Figura 32, p. 82), que assemelham-se com os máximos de

absorção 238 e 285 nm (Figura 28, p. 80) de C2 no tempo de retenção $T_r = 45.11$ min. (Figura 26, p. 79).

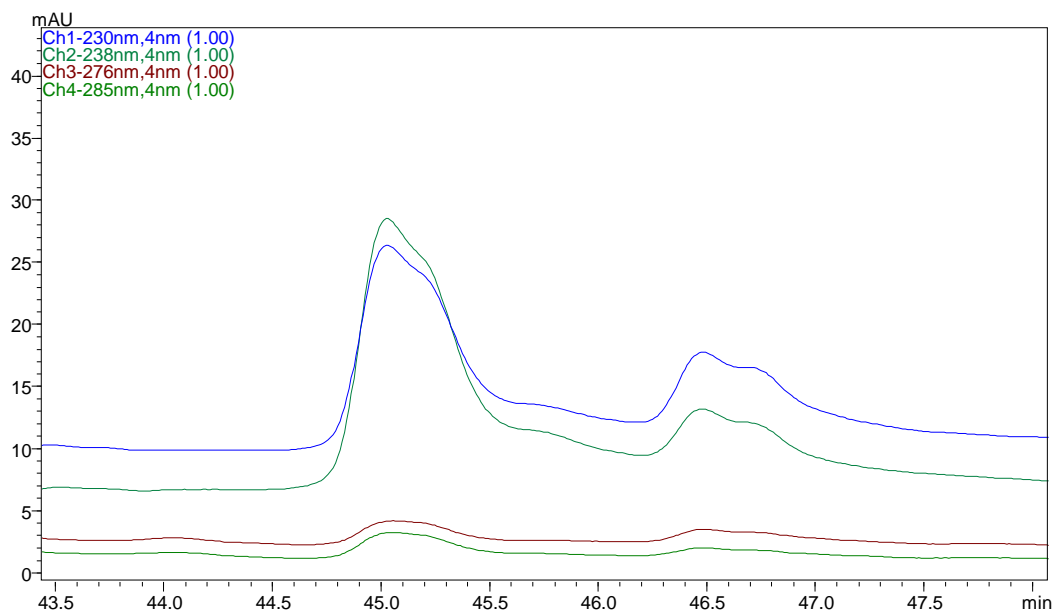


Figura 31. Expansão do cromatograma do extrato hidroalcolico das raízes.

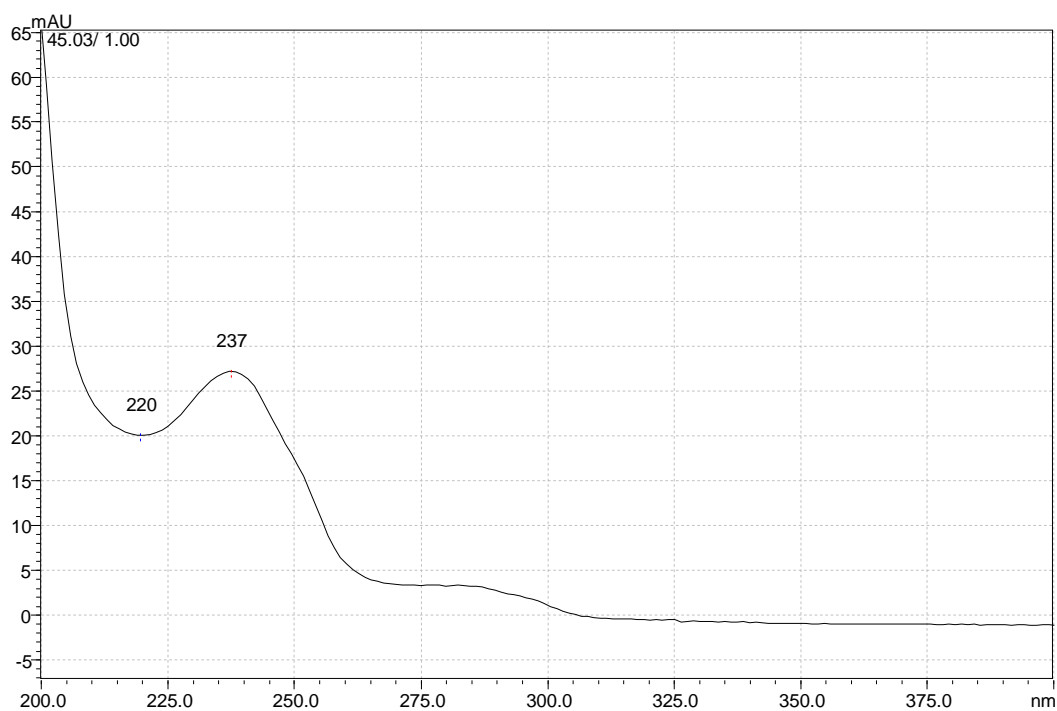


Figura 32. Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,03$ min do extrato hidroalcolico das raízes.

No pico de tempo de retenção $T_r = 45.11$ min. (Figura 33, p. 83) do cromatograma das Semente, observou-se no espectro de ultra-violeta os máximos de absorção em 237 e 283 nm (Figura 34, p. 83), que assemelham-se com os máximos de absorção 238 e 285 nm (Figura 28, p. 80) de C2 no tempo de retenção $T_r = 45.11$ min.

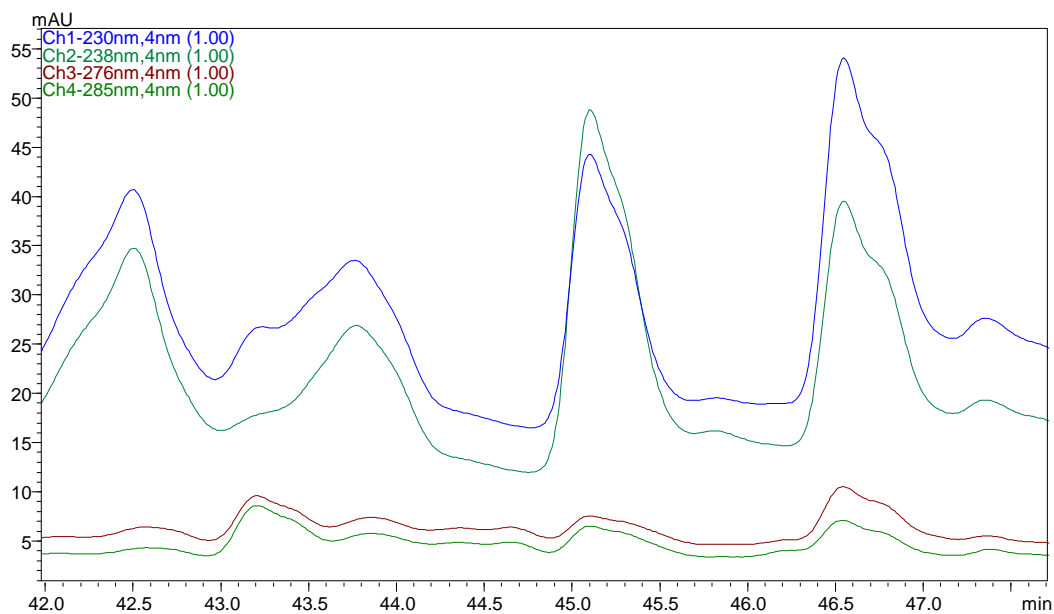


Figura 33. Expansão do Cromatograma do extrato hidroalcoólico das sementes.

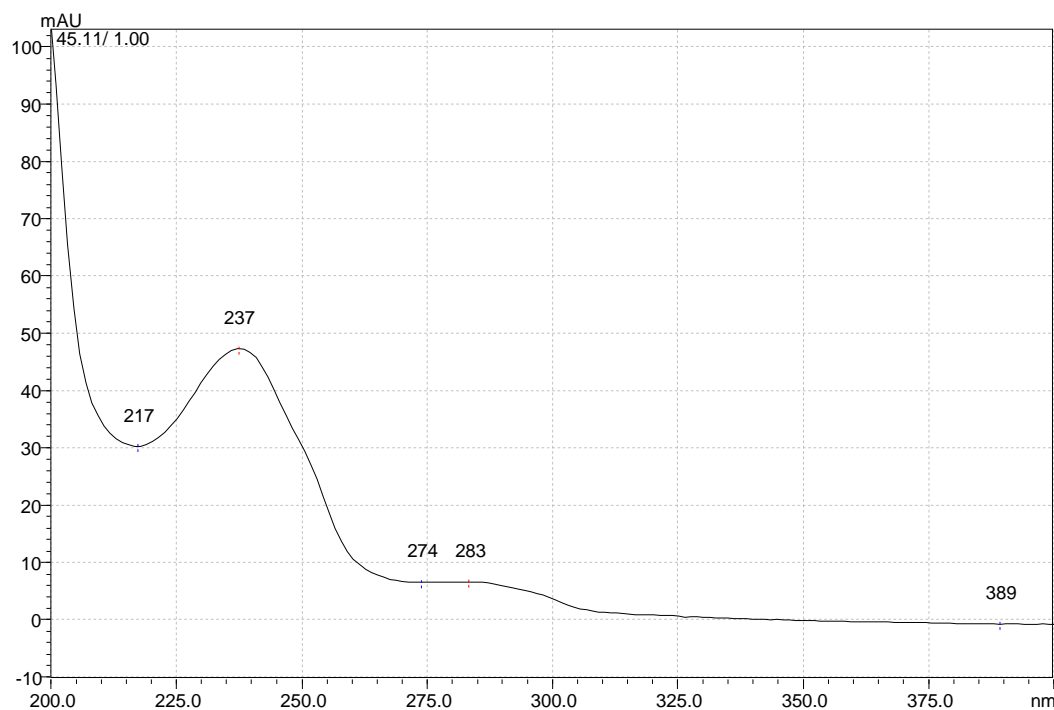


Figura 34. Espectro de ultravioleta do pico em $T_r = 45,11$ min. do extrato hidroalcoólico das sementes.

A discussão deteve-se mais na epicatequina (C2), pois não foi observada relação entre os picos presentes nos cromatogramas da FV, S e R, com o pico do padrão da catequina (C1), a qual aparentemente não está presente nesses extratos.

A substância epicatequina, com potencial alelopático já comprovado anteriormente (GOLISZ, et al., 2007; LÔBO, et al., 2008), provavelmente contribuiu para a elevada atividade alelopática observada nos bioensaios com os extratos brutos sobre a germinação das sementes, já que os triterpenóides isolados não exibiram, na concentração testada, qualquer atividade sobre esse parâmetro.

6 CONCLUSÕES

Os extratos brutos hidroalcoólicos testados, principalmente os das folhas e raízes, mostraram elevada atividade alelopática sobre a germinação e desenvolvimento das plantas daninhas, confirmando que a espécie *Acacia mangium* deve ser considerada para os estudos em alelopatia.

As substâncias lupenona e lupeol, isoladas e em par, na concentração testada, evidenciaram baixo efeito alelopático.

O pH da solução influenciou a atividade alelopática das substâncias lupenona e lupeol, isoladamente e em par, mostrando que este fator é ponto importante a ser considerado em trabalhos de campo.

A substância epicatequina foi detectada nos extratos brutos hidroalcoólicos das folhas verdes, raízes e sementes, indicando que esta pode ter influenciado positivamente a elevada atividade alelopática desses extratos.

REFERÊNCIAS

ABBADO, M. R. Efeito alelopático de leguminosas utilizadas como adubo verde. Disponível em: <<http://www.unimar.br/ciencias/5-9-1.html>>. Acesso em: 17 jan. 2008.

ABRAHIM, D.; BRAGUINI, W. L.; KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth and mitochondrial respiration of maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 3, p. 611-624, 2000.

AHMAD, V. U.; ATTA-UR-RAHMAN. **Handbook of natural products data**. Volume 2: pentacyclic triterpenoids. H.E.J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Pakistan, 1994.

ALAIN, B. D.; MIYAMOTO, T.; YOSHIKAWA, K.; Arihara, S.; Lacaille-Dubois, M. A. Flavonoids from *Acacia pennata* and their Cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) Inhibitory Activities. **Planta Medica**, v.73, p.1202-1207, 2007.

ALMEIDA, F. S. **Alelopatia e as plantas**. Circular , 53. Londrina: IAPAR. 68 p. 1988.

ALMEIDA, F. S. Influência da cobertura morta na biologia do solo. **A Granja**, São Paulo, v. 4, n. 451, p. 52-67, 1985.

ALVES, P. L. C. A. Perspectivas da utilização de aleloquímicos no manejo de plantas daninhas. In: **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: Panorama atual e perspectivas na agricultura**. Ed. Embrapa Amazônia Oriental, p. 24-58, 2008.

AN, M. e PRATLEY, J. . **Searching native Australian plants for natural herbicides - a case study**. 4th World Congress on Allelopathy, 2005. Disponível em. <http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2727_anm.htm#TopOfPage>. Acesso em: 12 jan. 2009.

ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.; TORRES-BARRAGÁN, A. LÉON-CANTERO, R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decopositum*. **Journal of Chemistry Ecology**, v. 22, p. 393-403, 1996.

ANAYA, A.L.; Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n.6, p. 697-739, 1999.

ANDRADE, C. A.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; FERRONATO, M. L.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIN, L.; KERBER, V. A. Efeitos alelopáticos das flores da *Acacia podalyriaefolia* A. CUNN. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 93-98, Jul.- Dez. 2003b.

ANDRADE, C. A.; PEITZ, C.; SILVA, C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KEBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* – atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 47 - 56, Jan.- Jun. 2003a.

BANSAL, G. L.; BHAN, V. M. Status of research on allelopathy and future scope of work in Indian. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 63, n. 12, p. 769-776, 1993.

BARKOSKY, R. R.; EINHELLIG, F.A. Effects of salicylic acid on plant-water relationships. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 237-247, 1993.

BARKOSKY, R. R., EINHELLIG, F.A.; BUTLER, J.L. Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurgr *Euphorbia esula*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2095-2109, 2000.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v.2, p. 15-70, 1991.

BATRA, L.; KUMAR, A. Effects of alkalinity on germination, growth and nitrogen content of whistling (*Casuarina equisetifolia*) and bufwood (*C. galuca*). **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 63, n. 7, p. 412-416, 1993.

BAZIRAMAKENGA, R. LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 1271-1285, 1995.

BURKART, A. **Leguminosas - Mimosoideas. Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: P. Raulino Reitz, v. 1, p. 17-48, 1979.

CARVALHO, G. J. de; FONTANÉTTI, A.; CANÇADO, C. T. Potencialidades alelopáticas da mucuna preta (*Stilozobium aterrimum*) e do feijão porco (*Canavalia ensiformes*), no controle da tiririca (*Cyperus rotundus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 3. p. 647-651, maio/jun. 2002.

CARVALHO, S. C. I. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* ev. Marundu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirantes**. Dissertação. Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 72 p. 1993.

CARVALHO, G. A.

<www.den.ufla.br/Professores/Geraldo/Disciplinas/FEROMÔNIOS.doc>. Acesso em: 10 set. 2008.

CASTAÑEDA, P.; MATA, R.; LOTINA-HENNSEN, B.; ANAYA, A.L.; BYE, R. Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. **Journal Natural Products**, v. 9, p. 232-326, 1996.

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

CHOU, C. H.; FU, C. Y.; LI, S. Y.; WANG, Y. F. *Allelopathic potential of Acacia confusa* and related species in Taiwan. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 12, p. 2131-2150, 1998.

CHOU, C. H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J. PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy – a physiological process with ecological implications**. Netherlands: Springer, p. 1-10, 2006.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

CORNES, D. **Callisto: a very successful maize herbicide inspired by allelochemistry**. Allelopathy congress. Australia. 4th World Congress on Allelopathy, 2005. Disponível em. <http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2636_cornersd.htm#TopOfPage>. Acesso em: 13 jan. 2009.

DILDAY, R. H, NASTASI, P., LIN, J.; SMITH, R. J. Jr. **Allelopathic activity in rice (*Oryza sativa* L.) against ducksalad (*Heteranthera limosa* [Sw.] Willd.)** In: D. Hanson, MJ Schaffer. DA Ball and CV Cole eds. *Symposium Proc. on Sustainable Agriculture for the Great Plains*. USDA, ARS-89, p. 193-201, 1991.

DIXON, R. A.; SUMNER, L. W. Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. **Plant Physiology**, v. 131, pp. 878–885, mar. 2003, Disponível em: <www.plantphysiol.org> Acesso em: 05 nov. 2008.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO A. M.; SCHRADER. K. K.; ALLIOTA. G.; OLIVA. A. ROMAGNI. J. G. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**. v.50, p. 138-151. mar. - ap. 2002.

DUKE, S. O. Naturally occurring chemical compounds as herbicides. **Weed Science**., v. 2, p. 15-44, 1986.

DUKE, S. O.; SCHEFFLER, B. E.; DAYAN, F. E.; WESTON, L. A.; OTA, E. Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops. **Weed Technology**, v.15, p. 826-834. 2001.

DURAN, R. D.; TORTOSA, M. E. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of charclock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 155-163, 1985.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. **Noções sobre a alelopatia**. Boletim. Jaboticabal: UNESP/FUNEP. 28 p. 1993.

EINHELLIG, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 886-893, 1996.

EINHELLIG, F. A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: Congresso brasileiro de fisiologia vegetal. **Anais...** Lavras: UFLA. p. 59-74, 1995

FAY, P. K.; DUKE, W. B. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germoplasm. **Weed Science**, v. 25, p. 224-228, 1977.

FELIPE, M. R. e POZUELO, M.J. Las leguminosas: su valor nutritivo, medicinal y ecológico. **Schironia**: Revista científica del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid. n. 5, p. 50-57. dic. 2006.

FISCHER, N. H.; WILLIAMSON, G. B.; WEIDENHAMER, J. D.; RICHARDSON, D. R. In research of allelopathy in the Florida scrubs: the role of terpenoids. **Journal of Chemical Ecology**. v. 20, n. 6, p. 1355-1358, 1994.

FISCHER, N. H. the function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulation. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. (Eds.). **The science of allelopathy**, New York: John Willey, p. 203-218, 1986.

GALINDO, J. C. G., HERNÁNDEZ, A., DAYAN, F. E., TELLEZ, M. R., MACÍAS, F. A., PAUL, R. N.; DUKE, S. O.. Dehydrozaluzanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. **Phytochemistry**, v. 52, p. 805-813, 1999.

GOLISZ, A.; LATA, B.; GAWRONSK, S. W.; FUJII, Y. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. **Weed Biology and Management**, v. 7, p.164–171, 2007.

GONZÁLES, L; SOUTO, X. C; REIGOSA, M. J. Allelopathic effects of *Acacia melanoxylon* R. Br. *Phyllodes durina* their decomposition. In: **Forest Ecology**, v. 77, n. 1-3, p. 53-63, 1995.

GONZÁLEZ-BERNARDO, E., AGUILAR, M.I., DELGADO, G., KING-DIAZ, B. & LOTINA-HENNSEN, B. Photosynthetic electron transport interaction of xanthorrhizol isolated from *Isoetes heterophylla* and its derivatives. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 598-604, 2003.

HEJL, A. M., EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A. Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 559-567, 1993.

INDERJIT, D. K. M. M; KEATING, K. I. **Allelopathy: principles, procedures, processes, and promises for biological control**. Academic Press. Advances in Agronomy. v.67, 1999.

INDERJIT, D. K. M. M.; EINHELLIG, F. A. **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. ACS Symposium Series 582, Washington, DC. 1995b.

INDERJIT, D. K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, p. 28-44, 1995a.

Instituto de Pesquisas Florestais (IPF). Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/acacia.mangium.asp>. Acesso em: 03/10/2007.

JADHAV, B.B; GAYNAR, D.G. Allelopathic effects of *Acacia auriculiformis* A. *cunn.* On germination of rice and cowpea. In: **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 86-89, 1992.

JAIN, A.; SRIVASTAVA, H. S. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. **Physiology Plantarum**, v. 51, p. 339-342, 1981.

JAYAKUMAR, M.; MANIKANDAN, M. **Allelopathic potential of *Acacia leucopholea* on groundnut and sorghum**. Allelopathy congress. Australia. 4th World Congress on Allelopathy, 2005. <http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2469_jayakumarm.htm>. Acesso em: 20 nov. 2008.

JOSE, S.; GILLESPIE, A. R. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. **Plant and Soil**, v. 203, p. 199-205, 1998.

KALINOVA. J. Varietal differences in allelopathic potential of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Cereal Research Communications**. v. 36, n. 3, sep. 2008. Disponível em: <<http://www.akademai.com/content/830h3r4050451k62/>> Acesso em: 10 jan. 2009.

KHUSH, G., S. **Genetic improvement of rice for weed management**. En: Naylor, R., ed *Herbicides in Asian rice: transitions in weed management*. Palo Alto (California): Institute for Int. Studies, Stanford University and Manila (Filipines) Int. Rice Research Institute, p. 201-207, 1966.

KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNÁNDEZ-TERRONES, M. & LOTINA-HENNSSEN, B. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. In: BERNAL-LUGO, I.; LOZA-TAVERA, H. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**. Ciudad de México, p. 111-132, 2001.

LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: OEA, 173p. 1983.

LEATHER, G. R. Sunflowers (*Helianthus annuus*) are allelopathic to weeds. **Weed Science**, v. 31, p. 37-42, 1983.

LeBARON, H.M. Herbicide resistance in crop and weeds and its management. In TROPICAL WEED SCIENCE CONFERENCE. Kuala Lumpur. **Proceedings of the 3rd Tropical Weed Science Conference**, Kuala Lumpur [s,n,], p.23-24. 1992.

LEE, I. K.; MONSI, M. Ecological studies on *Pinus densiflora* Forest. I- Effects of plant substances on the floristic composition of the undergrowth. **Botanical Magazine**, v. 76, p. 400-413, 1963.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP : Instituto Plantarum, 367 p., 2003.

LOTINA-HENSEN, B.; Bernal-Morales, A.; Roo De Vivar, A.; Perez-C, A. L.; Castro-R, A.; Aguilar-Martinez, M. Inhibition of oxygen evolution by Zaluzanin-C. **Journal of Chemical Ecology**, v.18, n. 11, p. 1891-1990, 1992.

LOVETT, J. V.; HOULT, A. H. C.. Allelopathy and self-defense in barley. **Chem. Soc. Symp. Ser**, v. 582, p. 170-183, 1995.

MACIAS, F. A; SIMONET, A. M.; GALINDO, J. C. G. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic Potential. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, 1997.

MALLIK, A. U. On the question of paradigm in the science of allelopathy. In: REIGOSA, M. J. ; Pedrol, N. (eds) Allelopathy – from molecules to ecosystems. Enfield: Science Publisher, p. 289-298, 2002.

MARSARO JÚNIOR, A. L. Levantamento de pragas em plantios de *Acacia mangium* em Roraima. Disponível em: <<http://www.cpafr.embrapa.br/>>. Acesso em: 13 fev. 2008.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. 2001. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC. Porto Alegre. p. 527-554. 2001.

MULLER, C. H. Allelopathy as a factor in ecological process. **Vegetatio**, v. 18, p. 348-357, 1969.

MUZIC, T.J. **Weed biology and control**. New York: McGraw-Hill Book Company. 273p. 1970.

NARWALL, S. S. Potential and prospects of allelopathy mediated weed control for sustainable agriculture. **Jodhpur: Scientific Publishers**, p. 23-66, 1996.

NIMBAL, C. I., et al. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 54, p. 73-83, 1996.

NSOLOMO, V. R.; MRECHA, M. S.; MAGHEMBE, J. A. Effect of *Acacia xanthopholea* leachates on seed germination of some agricultural and multipurpose tree crops. **Journal of Tropical Forestry Science**, v. 7, n. 3, p. 398-404, 1995.

OHNO, S. et al. A species selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds. **Phytochemistry**, v. 56, p. 577-581, 2001.

PATRICK, A. Q., TOUSSOUN, T. A.; SNYDER, A. Phytotoxic substances in arable soils associated with decomposition of plant residues. **Phytopathology**, v. 53, p. 152-161, 1963.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Ensaio e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIRES, N. M.; PRATES, H. T.; PEREIRA FILHO, I. A. et al. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Science: Agriculture**, v.58, n.1, p.61-65, Jan./Mar. 2001.

PUTNAM, A. R.; DUKE, W.B. Biological suppression of weeds: evidence for allelopathy in accessions of cucumber. **Science**, v. 185, p. 370-372. 1974.

PUTNAM, A. R.; DEFRANK, J.; BARNES, J. P. Exploration of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, n. 8, p. 1001-1010, 1983.

PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. (eds.). **The science of allelopathy**, New York: John Willey, p. 203-218, 1986.

REZENDE, S. P. et al. **Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens**. Boletim agropecuário. Universidade federal de lavras. Zootecnia/Forrageira e Pastagens, UFLA, Lavras - MG. 56p. 2000.

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

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

RIOS, M.Y. Terpenes, coumarins and favones from *Acacia pennatula*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 3, 2005.

RIZVI, S.G.H. ; RIZVI, V. (Eds.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. Chapman and Hall, London. 1992.

RIZVI, S.J.H., et al. Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, p. 773-796, 1999.

RODRIGUES, L. R. A.; ALMEIDA, A. R. P.; RODRIGUES, T. J. D. Alelopatia em forrageiras e pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DE PASTAGENS, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, p. 100-129. 1993.

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

ROLIM DE ALMEIDA, L. F.; DELACHIAVE, M. E.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; MANCINI, E.; FEO, V. *In vitro* allelopathic potential of *Leonurus sibiricus* L. leaves. Department of Botany, Sao Paulo State University, Sao Paulo, Brazil. **Journal of Plant Interactions**, V. 3, n. 1, p. 39-48, 2008.

SAFFAN, S. E.; SALAMA, H. M. Influence of allelopathic of *Acacia raddiana* leaf extract on germination and some metabolites seedling of lupine termis. Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, **Egyptian Journal of Biotechnology**, v. 21. p. 32-43, 2005.

SANNOMIYA, M. **Análise fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *latifolium* e *Lonchicarpus montanus*: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual d Campinas. Set. 2001.

SANTOS, J. C. L.; CARVALHO, A. T.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA, G. R. F.; SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, F. L.; RIPARDO FILHO, H. S.; SANTOS, L. S. **Bioensaios de alelopatia com extratos aquosos obtidos de *Calopogonium muconoides***. 47^o Cong. Brás. Quim., 2007. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/1/1-331-476.htm>. Acesso em: 13 jan. 2009.

SANTOS, L. S.; SANTOS, J. C. L.; SOUZA FILHO, A. P. S.; CORRÊA, M. J. C.; VEIGA, T. A. M.; FREITAS, V. C. M.; FERREIRA, I. C. S.; GONÇALVES, N. S.; SILVA, C. E. e GUILHON, G. M. S. P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim marandu e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 3, p. 531-538, 2008.

SCHREINER, O.; SULLIVAN, M. K. Soil fatigue caused by organic compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 6, p. 39-50, 1969.

SILVA, G. A.; LOBO, L. T.; SOUZA FILHO, A. P. S.; SILVA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, A.C.; SANTOS, L. S.; ARRUDA M. S. P. **Estudo fitoquímico e da atividade alelopática de *Derris urucu***. 48^o Cong. Brás. Quim. 2008. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/7/7-317-2997.htm>. Acesso em: 13 jan. 2009.

SILVA, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. **Boletim Geográfico**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.

SOUZA, I. F.; FURTADO, D. A. S. Caracterização de aleloquímicos do centeio (*Secale cereale*) e seu potencial alelopático sobre plantas de alface (*Lactuca sativa*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1097-1099, set./out., 2002.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Livraria Embrapa. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 260p. 2002.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Germinação de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas: *Mimosa pudica* e *Ipomoea asarifolia*. **Planta Daninha**, v. 19, n. 1, p. 23-31, 2001.

SOUZA FILHO, A. P. S. Santos, R. A.; Santos, L. S.; Guilhon, G. M. P; Santos, A. S.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, dez. 2006c.

SOUZA FILHO, A. P. S.. Interferência potencialmente alelopática do capim-gengibre (*Paspalum maritimum*) em áreas de pastagens cultivadas. **Planta daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, Sept. 2006b.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. **Planta Daninha**, v. 16, n. 1, p. 2-11, 1998a.

SOUZA FILHO, A. P. S. **Alelopatia e as plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 159p. 2006a.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. Potencial alelopático de plantas de Acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 435-441, 2000b.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. e FIGUEIREDO, F. J. C.. Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e da densidade de sementes da planta receptora. **Planta daninha**, v. 21, n. 2, p. 211-218, 2003.

SOUZA FILHO, A. P. S.; FONSECA, M. L.; ARRUDA, M. S. P. Substâncias químicas com atividade alelopática presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha**, v.23, n.4, p.565-573, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M.; TEIXEIRA NETO, J. F. Efeitos de diferentes substratos e da profundidade de semeadura da germinação de sementes de mata-pasto e malva. **Planta Daninha**, v. 16, n. 1, p. 67-74, 1998b.

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

SOUZA, I. F.; FURTADO, D. A. S. Caracterização de aleloquímicos do centeio (*Secale cereale*) e seu potencial alelopático sobre plantas de alface (*Lactuca sativa*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. V.26, n.5, p.1097-1099, set./out., 2002.

SOUZA, L. S. VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 343-354, 2003.

THEISEN, G.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. Redução da infestação de *Brachiaria plantaginea* em soja pela cobertura do solo com palha de aveia-preta. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 4, p. 753-756, 2000.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Potencial de utilização de cobertura vegetal de sorgo e milho na supressão de plantas daninhas em condição de campo: II - Efeitos da cobertura morta. **Planta daninha**, Viçosa, v. 22, n. 1, Mar. 2004.

TUKEY JÚNIOR, H. B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Botanical Review**, Bronx, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1969.

VELINI, E. D. Comportamento de herbicidas no solo. In: CONGRESSO DE PLANTAS DANINHAS EM OLERÍCOLAS, 1991, Botucatu. SBPD. **Anais...** Botucatu: p.105-128. 1991.

VIDAL, R. A. **Amount of crop residues in no-till farming affects weed-crop ecosystems**. 1995. 161 f. Thesis (Ph.D.) - Purdue University, West Lafayette, 1995.

WEIDENHAMER, J. D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 866-875, 1996.

WESTON, L. A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 860-866, 1996.

WU, H., Pratley, H., Lemerle, D. y Haig, T. Crop cultivars with allelopathic capability. **Weed Res**, v. 39, p. 171-180, 1999.

YAMAGUSHI, M. Q.; ANDRADE, H. M.; PARDÓCIMO, E. M.; PORTILHO, G. P.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Efeito de extratos aquosos de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) sobre a germinação e crescimento de repolho (*Brassica oleracea* L.) e de nabo (*Brassica rapa* L.), **Revista Científica da FAMINAS**. Muriaé-MG, v. 3, n. 1, p. 262, jan.-abr, 2007.

YU, J. Q., YE, S. F., ZHANG, M. F.; HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p.129, 2003.