

16351  
MFN=0432

**JOSIRLEY DE FÁTIMA CORRÊA**

**POTENCIALIDADES ALELOPÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DE  
ALGUMAS SUBSTÂNCIAS DE FOLHAS DE  
*Eupatorium maximiliani* Schrad.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Dr. ITAMAR FERREIRA DE SOUZA

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E  
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Corrêa, Josirley de Fátima

Potencialidades alelopáticas e identificação de  
algumas substâncias de folhas de *Eupatorium*  
*maximiliani* Schrad. / Josirley de Fátima Corrêa. --  
Lavras : UFLA, 1996.

58p. : il.

Orientador: Itamar Ferreira de Souza

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Eupatorio. 3. Aleloquímico 4.  
Identificação. 5. Fisiologia vegetal. 6. Planta  
invasora. 7. Erva Daninha. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

CDD-581.524

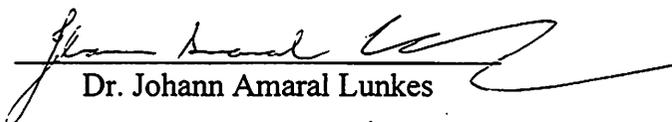
**JOSIRLEY DE FÁTIMA CORRÊA**

**POTENCIALIDADES ALELOPÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DE  
ALGUMAS SUBSTÂNCIAS DE FOLHAS DE  
*Eupatorium maximiliani* Schrad.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Mestrado em Agronomia, área de concentração em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 27 de setembro de 1996

  
Dra. Maria Cláudia Marx Young

  
Dr. Johann Amaral Lunkes

  
Prof. Dr. Itamar Ferreira de Souza  
(Orientador)

Aos meus pais Angelina e Sebastião

pelo incentivo e exemplo de vida,

**MINHA HOMENAGEM**

Aos meus irmãos

Josiane, Janderson, Jeferson, Joyce,

minha cunhada Amélia

e meu sobrinho Otávio

**DEDICO**

Ao meu noivo Renato

com carinho

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Biologia (DBI) pela realização deste curso.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo (IBt), em especial aos pesquisadores e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade de realização da parte experimental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Itamar Ferreira de Souza e Dra. Angela Maria Ladeira pela valiosa orientação e coorientação, respectivamente, incentivo e amizade.

À Dra. Cláudia Marx Young, pelas sugestões apresentadas durante todo o trabalho e amizade.

À Dra Mitsue Haraguchi, (Instituto Biológico de São Paulo), Dr. Edson Rodrigues Filho e à Marcela (Universidade Federal de São Carlos) pelo auxílio nas análises espectrais.

Ao Dr. Johanin Amaral Lunkes pelas sugestões apresentadas no desfecho deste trabalho.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, Luiz Edson, Amauri, José Donizeti, Renato e Angela pelos conhecimentos transmitidos.

Aos alunos de pós graduação em Fisiologia Vegetal da UFLA e aos amigos do IBt, em especial à Cristina e Susy.

Às amigas Ana e Moemy pelas boas risadas, convivência fraternal e apoio.

À minha tão **QUERIDA** turma de pós graduação, Poliana, Marlos, Marcel, Vespasiano e ao inesquecível amigo **André**, que partiu de nosso convívio, mas que estará sempre vivo em nossos corações.

E à todos que com sua amizade e incentivo contribuíram para a concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Aspectos relacionados à espécie em estudo .....	3
2.2 Alelopatia: histórico e conceito .....	4
2.3 Alelopatia x competição .....	5
2.4 Produção de aleloquímicos .....	6
2.5 Autotoxicidade .....	7
2.6 Liberação e persistência de aleloquímicos no solo .....	7
2.7 Natureza química .....	9
2.8 Função e ação de aleloquímicos .....	10
2.9 Modo de ação .....	10
2.10 Dinâmica de aleloquímicos na natureza .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Coleta e preparo do material vegetal .....	15
3.2 Testes químicos .....	15
3.2.1 Preparação do extrato CM (Clorofórmio:Metanol 2:1) e aplicação em cromatografia em camada delgada (CCD) .....	15
3.2.2 Fracionamento do extrato CM em coluna de sílicagel .....	16
3.2.3 Identificação e determinação estrutural das substâncias purificadas .....	17
3.3 Testes biológicos .....	18
3.3.1 Bioensaios para avaliação dos efeitos do extrato CM nas espécies teste .....	18
3.3.1.1 Efeitos na germinação .....	18
3.3.1.2 Efeitos no comprimento da radícula e parte aérea .....	19

	Página
3.3.2 Efeito das frações do extrato CM na germinação de sementes e crescimento de radícula plântulas de alface .....	20
3.4 Análise estatística .....	21
4 RESULTADOS .....	22
4.1 Testes químicos .....	22
4.1.1 Resultado da cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato CM .....	22
4.1.2 Fracionamento cromatográfico do extrato CM em coluna sílicagel .....	23
4.1.3 Identificação estrutural das substâncias purificadas, Em-1 e Em-2 .....	26
4.1.3.1 Dados espectroscópicos .....	27
4.2 Testes biológicos .....	29
4.2.1 Bioensaios para avaliação dos efeitos do extrato CM nas espécies teste .....	29
4.2.1.1 Efeitos na germinação .....	29
4.2.1.2 Efeitos no comprimento da radícula e parte aérea .....	30
4.2.2 Efeito do extrato CM após fracionamento, na germinação de sementes e crescimento de radícula plântulas de alface .....	31
5 DISCUSSÃO .....	34
6 CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
APÊNDICE .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Frações do extrato CM submetido à cromatografia em coluna de silicagel eluída com solventes de polaridades crescentes. UFLA, Lavras - MG, 1996 ...	23
2	Cor e valores de $R_f$ das substâncias presentes nas frações 8, 10 e 11 após CCD (sílica gel G tipo 60, fase móvel = tolueno:acetona 85:15) e observação sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	24
3	Deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ em $\text{CDCl}_3$ ) para Em-1 e Em-2 comparados com os dados registrados na literatura para as substâncias 1 <sup>1</sup> e 2 <sup>2</sup> . UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	28
4	Porcentagem e tempo médio de germinação de espécies cultivadas e daninhas na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	29
5	Comprimento de radícula e/ou parte aérea (cm) de plântulas de milho, arroz, alface na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	30
6	Efeito do extrato CM após fracionamento em coluna de sílica gel na germinação de sementes e comprimento de radícula de plântulas de alface. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema da cromatoplaca do extrato CM de folhas de eupatório desenvolvida em tolueno:acetona 4:1, observada sob luz UV e revelada com vapores de iodo. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	22
2	Cromatoplaca das frações 8, 10 e 11 (da esquerda para direita) desenvolvida em tolueno:acetona 85:15 e observada sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	24
3	Cromatoplas das frações 4 (A), 6 (B) e 12 (c) após 2º fracionamento em coluna de sílicagel e realização de CCD (sílicagel GF <sub>254</sub> , fase móvel = tolueno:acetona 65:35, para A e B e tolueno:acetona 80:20 para C) e observação sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	26
4	Substâncias identificadas do extrato CM de folhas de <i>Eupatorium maximiliani</i> Schrad. UFLA, Lavras - MG, 1996 .....	27
5	Estrutura básica de um flavonóide (Salisbury e Ross, 1991) .....	37

## SÍMBOLOS E ABREVIações

EM	- Espectro de massa
IV	- Infravermelho
Kbr	- Brometo de potássio
M <sup>+</sup>	- Íon molecular
m/z	- Relação massa carga
RMN <sup>1</sup> H	- Ressonância magnética nuclear de próton
RMN <sup>13</sup> C	- Ressonância magnética nuclear de carbono13
s	- Singlete
UV	- Ultravioleta
dd	- Duplo duplete
J	- Constante de acoplamento
TMS	- Tetrametilsilano
CDCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio deuterado
δ	- Deslocamento químico
ν	- Número de onda
CCD	- Cromatografia de camada delgada

## RESUMO

CORRÊA, J. de F. **Potencialidades alelopáticas e identificação de algumas substâncias de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad.** Lavras: UFLA, 1996. 58p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).\*

O objetivo do presente trabalho foi estudar o potencial alelopático do extrato de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad, preparado exaustivamente em clorofórmio:metanol 2:1 (CM), sobre quatro espécies cultivadas e duas espécies consideradas invasoras de culturas. O extrato CM reduziu significativamente a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv Grand rapids), caruru (*Amaranthus* sp.) e picão preto (*Bidens pilosa* L), sendo que para as duas últimas espécies ocorreu 100% de inibição. O crescimento de radícula e parte aérea de alface, feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv Carioquinha) e arroz (*Oryza sativa* cv Caiapó de sequeiro) foram também significativamente reduzidos. Para o milho (*Zea mays* L. cv AG 302A), não ocorreram efeitos significativos em nenhum dos parâmetros analisados. O extrato CM foi posteriormente fracionado em coluna de sílicagel, submetido a CCD (cromatografia de camada delgada), para isolamento e verificação da atividade alelopática das substâncias presentes no extrato. Várias frações resultantes deste processo exibiram atividade na germinação e/ou crescimento de radícula de alface, ou seja, diversos compostos foram responsáveis pela atividade do extrato de folhas de eupatório. Através da purificação de algumas das frações acima mencionadas, foi possível identificar dois constituintes de natureza flavonoídica: (a) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona e (b) 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavanona, com base nos dados espectrais de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, EM, IV. Bioensaios em placa de Petri, revelaram que a primeira

---

\* Orientador: Itamar Ferreira de Souza. Membros da banca: Maria Cláudia Marx Young, Johann Amaral Lunkes.

substância estimulou a germinação e o crescimento de radícula de plântulas de alface, embora somente para o último parâmetro os resultados tenham sido significativos. A atividade do outro flavonóide não foi ensaiada individualmente, todavia a fração 6 da qual foi isolado apresentou significativa atividade biológica. Estes resultados comprovam o potencial alelopático do extrato de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad. e indicam que várias substâncias são responsáveis por sua ação inibitória as quais, de forma individual podem causar efeitos diferenciados.

## ABSTRACT

### ALLEOPATHIC POTENTIALITIES AND IDENTIFICATION OF SOME SUBSTANCES OF *Eupatorium maximiliani* SCHRAD. LEAVES

In this work, was studied the allelopathic potential of the extract of *Eupatorium maximiliani* Schrad. leaves, prepared exhaustively in chloroform: methanol 2:1 (CM) upon four cultivated species and two species considered as crop invaders. The CM extract decreased significantly the germination of lettuce (*Lactuca sativa*), amaranth (*Amaranthus* sp.) and picão preto (*Bidens pilosa*) seeds, being that for the two latter species, there was 100 % of inhibition had taken place. The growth of radicle of lettuce, bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and rice (*Oryza sativa*) were also significantly reduced. To corn (*Zea mays* L.), no significant effect occurred in any of the analysed parameters. The CM extract was later fractioned in gel silica column, submitted to TLC (Comparative thin layer chromatography) for isolation, identification and verification of the allelopathic activities of substances present in the extract. A number of fractions resultant from this process showed activity in germination and/or growth of lettuce radicle, this is, several compounds were responsible for the activity of the *Eupatorium maximiliani* leaf extract. By means of  $H^1$ MNR,  $C^{13}$ MNR, IV and EM, two flavonoids were identified: 5,6,7,3',4', 5'-Hexametoflavon and 5,6,7,3',4', 5'-Hexametoflavonan. Bioassays on Petri dish revealed that the former substance stimulated both germination and growth of radicle of lettuce seedlings, although also to the latter parameter, the results have been significant. The ativity of the other flavonoid was not assayed individually however fraction 6 from which it was isolated showed significant biological activity. These results proved the allelopathic potential of the extract of *Eupatorium maximiliani* Schrad leaves and point out that various substances are responsible for their inhibitory action which, in an individual manner, can cause different effects.

## 1 INTRODUÇÃO

O termo alelopatia pode ser entendido como qualquer efeito causado direta ou indiretamente por um organismo sobre o outro, através da liberação num ecossistema, de substâncias químicas por ele elaboradas (Almeida, 1988).

Tanto plantas quanto microorganismos podem ser considerados como doadores ou receptores desses químicos, os quais podem modificar seu crescimento, desenvolvimento e distribuição (Einhellig e Leather, 1988).

Os aleloquímicos como são chamados esses compostos com propriedades alelopáticas podem ser produzidos em qualquer órgão vegetal, porém em concentrações muito baixas e variáveis com características intrínsecas à planta, como por exemplo espécie e idade, bem como pelas condições edafoclimáticas a qual está exposta.

Quanto ao modo de ação, interferem na conservação, dormência e germinação de sementes, crescimento das plântulas e vigor vegetativo das adultas por atuarem em funções vitais como respiração, fotossíntese, divisão celular, nutrição e reprodução (Almeida, 1988). Atuam ainda sobre os esporos de fungos, desenvolvimento de microorganismos, insetos e nematóides (Putnam e Duke, 1978).

Essas substâncias reduzem a competição de outras plantas por atuarem no seu desenvolvimento, defendem as plantas de herbívoros pelo seu paladar desagradável e/ou por serem venenosas, protegem-nas de patógenos inibindo o desenvolvimento dos mesmos, têm ação repelente ou atraente sobre insetos (Almeida, 1991).

Ao longo dos anos, vários trabalhos têm sido conduzidos na tentativa de incorporar o fenômeno da alelopatia ao processo produtivo, objetivando aumentar a produtividade das culturas. Entre outras linhas de pesquisa, diversos estudos têm sido dirigidos no sentido de criar novas estratégias de controle de plantas daninhas para complementar métodos químicos, mecânicos, culturais e biológicos (Souza e Gleissman, 1993).

Assim sendo, não se tem como objetivo eliminar completamente o uso de herbicidas, mas explorar a alelopatia como um adicional ao mesmo. Isto poderia minimizar os custos de produção, aumentar a eficiência de controle, prevenir problemas de tolerância ou resistência das ervas daninhas a herbicidas e ainda reduzir o impacto destes químicos sobre o meio ambiente.

O conhecimento da natureza química dos compostos alelopáticos por outro lado, pode tornar possível através de intensos programas de melhoramento, a obtenção de cultivares que defendam-se naturalmente da competição de ervas, e sejam simultaneamente imunes a pragas e doenças (Almeida, 1988), sendo que a limitação atual para este tipo de abordagem é que a autotoxicidade deve ser evitada (Einhellig e Leather, 1988).

Admite-se a possibilidade de modificação da estrutura química de um determinado aleloquímico visando o melhoramento de sua atividade, aplicação direta de produtos com características herbicidas, os chamados "herbicidas naturais" bem como a produção de análogos sintéticos em laboratório ( Mallik, Puchala e Grosz, 1994; Heisey, 1996). Acrescenta-se ainda a possibilidade de desenvolvimento desses compostos como reguladores de crescimento (Einhellig e Leather, 1988).

No Brasil os conhecimentos são ainda incipientes e o maior êxito que a alelopatia tem alcançado na agricultura é a prática de se deixar resíduos vegetais sobre o terreno formando o que se chama de cobertura morta. Desse modo a decomposição deste material se processa lentamente sendo a liberação dos aleloquímicos prolongada, assim como, seu efeito sobre as ervas (Almeida, 1988).

Tendo em vista a carência de estudos em torno da alelopatia, o presente trabalho objetivou analisar o potencial alelopático do extrato de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad. na germinação de sementes e/ou crescimento de radícula e parte aérea de plântulas de ervas invasoras (caruru - *Amaranthus sp.* e picão preto - *Bidens pilosa* L.) e plantas cultivadas (arroz - *Oryza sativa* cv Caiapó de sequeiro; milho - *Zea mays* L. cv AG 302 A; feijão - *Phaseolus vulgaris* L. cv Carioquinha e alface - *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) e testar a atividade biológica de compostos isolados e/ou identificados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos relacionados à espécie em estudo

O gênero *Eupatorium* encerra cerca de 600 espécies, distribuídas por regiões de clima tropical e subtropical no mundo, mas principalmente nas Américas. No Brasil ocorrem cerca de 250 espécies sendo que muitas delas em certas regiões podem apresentar características infestantes (Kissman, 1992). Segundo Mantovani (1983), é um dos gêneros de maior destaque na Reserva Ecológica e Experimental de Moji-Guaçu SP.

Numerosos trabalhos fitoquímicos têm sido realizados com espécies deste mesmo gênero, mas principalmente com objetivo de estudar suas propriedades medicinais, assim, diversos compostos tem sido isolados e identificados.

Flavonóides e outros compostos polifenólicos foram encontrados em *Eupatorium subhastatum* (Ferraro et al., 1987; Ferraro, Martino e Coussio, 1988); lactonas sesquiterpênicas em *Eupatorium quadrangulare* (González et al., 1985; Hubert, Okunade e Wiemer, 1987); flavonóides em *E. glandulosum* (Nair et al., 1993; Nair et al., 1995) e *E. tinifolium* (D'Agostino et al., 1990); flavonóides, lactonas sesquiterpênicas e alcalóides em *E. altissimum* (Boeker et al., 1986); polifenóis em *E. buniifolium* (Caula et al., 1991); cadinenos em *E. adenophorum* (Bordoloi, Shukla e Sharma, 1985); monoterpenos voláteis em *E. tashiroi* (Wu et al., 1985) e diterpenos em *E. turbinatum* (Jakupovic et al., 1986).

Esses dados mostram que tais plantas são ricas em princípios ativos os quais podem também interagir de diversas maneiras com plantas, microorganismos e animais. Algumas espécies com potencial alelopático encontradas na literatura foram: *E. adenophorum* (Bordoloi, Shukla e Sharma, 1985), *E. capillifolium* (Macdonald et al., 1994) e *E. riparium* que tiveram atividades antifúngicas para *Cladosporium cladosporioides*, *Alteranaria tenuis*, *Botrydiplodia thebromae*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Cercospora*

*nicotianae*, sendo que a toxicidade para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi comparável a um fungicida comercial (Bandara et al., 1992).

*Eupatorium maximiliani* Schrad, o eupatório, é uma planta perene, arbustiva, ereta, ramificada, de ramos pubescentes e estriados, espécie daninha que frequentemente infesta pastos, beiras de estradas e terrenos baldios (Lorenzi, 1991).

## 2.2 Alelopatia: histórico e conceito

Os primeiros registros sobre a habilidade das plantas influenciarem o desenvolvimento de outras, foram feitos por Democritus (500 a.C.) e Theophrastus (300 a.C.), os quais expuseram que a leguminosa *Cicer arietinum* exauria o solo (Smith e Secoy, 1977 citado por Gomide, 1993).

A partir daí vários foram os relatos acerca da alelopatia sendo que, De Candolle (1832) citado por Rice (1984), afirmava que, o cansaço das terras decorrente da monocultura durante anos seguidos, era ocasionado pelo acúmulo de alguma substância exsudada pela cultura, a qual passava a afetar o seu próprio desenvolvimento.

Porém, foi somente na década de 1930 que a palavra alelopatia foi cunhada para explicar as interações que ocorrem em comunidades vegetais (Rodrigues, Rodrigues e Reis, 1992).

O termo alelopatia foi criado por Molisch em 1937, pela união de duas palavras gregas; **allelon** (mútuo) e **pathos** (prejuízo) e, apesar de sua etimologia tem sido interpretada de várias maneiras.

Este termo já foi usado de forma restrita por alguns autores para se referir exclusivamente aos efeitos prejudiciais, diretos ou não de uma planta sobre a outra, porém numa conotação mais abrangente, refere-se a compostos que ao serem liberados por um organismo podem prejudicar ou favorecer o desenvolvimento de outro.

Alguns aleloquímicos sesquiterpênicos por exemplo, inibiram ou estimularam a germinação das espécies testadas em trabalhos realizados por Fischer, Weidenhamer e Bradow (1989), o que foi dependente do tipo de composto e da especificidade das espécies ou cultivares.

Em trabalhos realizados por Li et al., (1992), sugeriu-se que a espécie *Sasa cernua* poderia exibir o seu efeito alelopático de maneira direta via liberação de aleloquímicos voláteis no ar ou exsudação de ácidos fenólicos na rizosfera e/ou de modo indireto através do abaixamento de pH causado por estes compostos.

Atualmente alguns produtores relatam que ao processarem a sucessão de culturas, são constatados problemas de diminuição de população e menor crescimento de espécies cultivadas (Lucchesi e Oliveira, 1988; Kil e Lee, 1987).

### 2.3 Alelopatia x competição

O efeito alelopático depende então de compostos químicos que são adicionados ao ambiente. Por outro lado, uma planta pode afetar o crescimento de outra, sem que haja o efeito da alelopatia, através da competição por algum fator do meio como água, luz e nutrientes (Rodrigues, Rodrigues e Reis, 1992).

A esse respeito, Einhellig e Leather (1988), relataram que historicamente os problemas com plantas daninhas têm sido observados somente sob o ponto de vista da competição, e nenhuma abordagem tem dividido as perdas econômicas em um campo infestado, de acordo com interferências alelopáticas e competição.

Na natureza estes mecanismos atuam concomitantemente, sendo difícil distinguir e identificar os efeitos individuais devido à complexidade biológica do processo (Durigan e Almeida, 1993). Entretanto, a diferença fundamental entre competição e alelopatia é, pois, da primeira se dar pela retirada de elementos do meio ambiente e a segunda pela sua introdução (Almeida, 1991).

Weidenhamer, Morton e Romeo (1987), relataram que o efeito de um aleloquímico depende da sua concentração e da quantidade total de fitotoxina disponível para a absorção, pois, análogo ao que acontece com qualquer nutriente, as plantas competem pelas fitotoxinas disponíveis.

O fenômeno de competição pelas fitotoxinas deveria ser considerado nos experimentos de casa de vegetação e de campo em alelopatia. Alta densidade de plantas e/ou pequeno volume de fitotoxinas por vaso, produzem resultados que não suportam a hipótese de

que, uma vez a toxina estando presente e em determinadas concentrações, o efeito alelopático pode ser observado. Do mesmo modo, em bioensaios de laboratório o volume de extrato por placa e/ou número de sementes deve ser cuidadosamente avaliado.

Os mesmos autores sugeriram ainda que, experimentos variando a densidade de plantas poderiam propiciar uma ferramenta útil para demonstrar a presença de compostos alelopáticos no solo. Resultados tais como redução no crescimento das plantas quando a densidade é reduzida é um efeito contrário à competição e normalmente observado quando as plantas competem umas com as outras pelo aleloquímico, sendo possível separar assim, efeitos alelopáticos de efeitos competitivos (Weidenhamer, Morton e Romeo, 1987).

## 2.4 Produção de aleloquímicos

As plantas têm a capacidade de produzir aleloquímicos em todos os seus órgãos, se bem que, num mesmo indivíduo, a natureza química e quantidade não seja necessariamente igual em todos eles (Almeida, 1988). Diferem com a espécie, a idade, órgão da planta, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera, composição dos solos onde se encontram as raízes (Einhellig, 1985), sazonalidade (Dolling, Zackrisson e Nilsson, 1994), bem como com qualquer tipo de estresse biótico ou abiótico.

Em *Parthenium hysterophorus* L. as folhas e inflorescências apresentaram maiores quantidades da lactona sesquiterpênica partenina seguidos pelos caules e raízes, enquanto que a concentração de ácidos fenólicos totais foi mais alta nas folhas seguida pela inflorescência, raízes e caules (Kancham e Jayachandra, 1980).

Plantas cultivadas em laboratório e no campo mostraram diferenças significativas na concentração de compostos fenólicos. Fatores ambientais, particularmente a intensidade luminosa, foram responsáveis por essas diferenças em plantas de *Sorghum bicolor*. O ataque por insetos e fungos aumentou o seu conteúdo em um grau variável com a cultivar e estágio de desenvolvimento (Woodhead, 1981).

## 2.5 Autotoxicidade

Muitos aleloquímicos são autotóxicos, porém, as plantas possuem mecanismos de defesa. Uma forma é mantendo-os biologicamente inativos, por exemplo, na forma de cristais insolúveis, outra isolando-os em compartimentos celulares, como por exemplo em vacúolos (Newman, 1978). A volatilização dos metabólitos é também uma forma de escape dos autotoxicantes sem gasto de energia (Almeida, 1988).

Nair e Putnam (1989), afirmam que a grande maioria dos aleloquímicos com efeito herbicida, encontram-se nas plantas em formas conjugadas, não tóxicas, sendo que sua fitotoxicidade é alcançada quando a planta passa por algum tipo de estresse ou pela morte do tecido.

Heisey (1996), sugere que a elucidação dos mecanismos que evitam a autotoxicidade poderia propiciar informações úteis para otimização das propriedades herbicidas dos aleloquímicos.

## 2.6 Liberação e persistência de aleloquímicos no solo

Evidências indicam que os compostos alelopáticos são liberados das plantas pela decomposição de folhas e caules por processos físicos ou biológicos, através de exsudação direta no solo pelas raízes ou através da deterioração de raízes mortas, por volatilização e podem ainda ser lixiviados da superfície das plantas pela chuva ou orvalho (Tukey, 1969; Lucchesi e Oliveira, 1988; Almeida, 1991; Durigan e Almeida, 1993).

Plantas de *Proboscidea louisianica* (Mill.) cultivadas com algodão (*Gossipium hirsutum*) podem reduzir substancialmente a produção da cultura. A planta é densamente coberta por pêlos glandulares, cada um com uma gotícula de óleo na extremidade, o que no campo causa um forte odor. Uma folha de *P. louisianica* separada de uma folha algodão somente por uns poucos centímetros de distância pode causar sua senescência e morte. Riffle et al., (1990), sugeriram que alguns aleloquímicos podem ser liberados das plantas para a atmosfera e solo por causa de seus baixos pesos moleculares e relativamente alta pressão de vapor.

Inderjit e Dakshini (1994), sugeriram que, o alto conteúdo de compostos fenólicos em campos cultivados associados com a daninha *Pluchea lanceolata*, poderia ser devido à lavagem de compostos solúveis em água de partes da planta através de processos naturais como água da chuva ou através de várias práticas agrícolas tais como irrigação e aração.

Segundo Souza (1988), as fitotoxinas voláteis podem ser absorvidas diretamente pela cutícula das plantas vizinhas, na forma de vapores ou serem condensadas pelo orvalho. Ao alcançarem o solo podem ser absorvidas pelas raízes, permanecerem no estado volátil, ser adsorvidas pelas partículas ou se dissolverem na solução do solo.

Para que os efeitos desses aleloquímicos sejam persistentes, estas substâncias devem acumular em quantidades suficientes para afetar outras plantas, persistir por algum período de tempo ou ser constantemente liberadas (Almeida, 1988; Weidenhamer, 1994).

Quanto à persistência desses compostos, Malik, Puchala e Grosz (1994), encontraram que o extrato aquoso da parte aérea parcialmente decomposta de *Chenopodium album* diminui gradualmente o seu efeito com o aumento do período de decomposição. Após aproximadamente 30 dias de decomposição, 40% do efeito inibitório, que tem como principal componente o ácido clorogênico, é perdido. Porém, 20% do composto persistiu no extrato da parte aérea após 30 dias de decomposição.

Resultados semelhantes foram obtidos por Patrick (1971), que constatou que as substâncias fitotóxicas são produzidas em maiores quantidades nos estágios iniciais da decomposição dos restos culturais. O autor acrescenta ainda, que os resíduos das culturas, triturados e incorporados no solo, têm um pico maior de liberação de aleloquímicos depois de três semanas de iniciada a decomposição, declinando até a sétima semana.

Heisey (1996), obteve o aleloquímico ailantona, cuja atividade é rapidamente perdida quando incubado à 25° C na presença de solo não estéril. Todavia, segundo o autor essa rápida degradação no solo, poderia consistir-se numa vantagem, pelo fato de prevenir sua toxicidade residual e permitir quase imediatamente o replantio nas áreas tratadas.

## 2.7 Natureza química

Quanto à natureza química, os aleloquímicos normalmente pertencem a um grupo conhecido como metabólitos secundários de plantas (Putnam e Duke, 1978; Durigan e Almeida, 1993), os quais são definidos por diversos autores como compostos que não desempenham papel conhecido na manutenção de processos vitais dos organismos que os sintetizam (Conn e Stumpf, 1981; Vickery e Vickery, 1981; Salisbury e Ross, 1991). Entretanto, recentemente têm-se demonstrado que eles exercem importantes funções ecológicas e representam estratégias alternativas para a sobrevivência das plantas.

Partindo-se da via do acetato malonato, do acetato mevalonato e do chiquimato, que são as principais rotas metabólicas, pode-se dividir os compostos secundários em 3 grandes grupos: substâncias terpênicas, compostos fenólicos e nitrogenados (alcalóides e glicosídeos cianogênicos) (Harbone, 1988).

Os compostos frequentemente encontrados na natureza incluem fenóis, como derivados dos ácidos cinâmico e benzóico, cumarinas, taninos e flavonóides; muitos terpenóides e poucos alcalóides, esteróides e quinonas (Einhellig e Leather, 1988).

Putnam e Duke (1978), sugerem que os metabólitos secundários implicados como agentes alelopáticos efetivos incluem ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos.

Conhece-se cerca de 10000 metabólitos secundários, e entre aqueles que já foram identificados somente uma pequena parte tem sido avaliada para sua atividade herbicida ou biorreguladora. Alguns metabólitos de plantas e microorganismos, segundo Einhellig e Leather (1988), poderiam ter aplicação potencial direta, enquanto outros, propiciariam novos compostos químicos os quais poderiam ser modificados para aumentar sua atividade biológica.

Como agentes aleloquímicos de *Chrysanthemum morifolium*, foram isolados ácido benzóico e 9 classes de ácidos fenólicos tais como salicílico, p-hidroxibenzóico, vanílico, gentísico, protocatecoico, siríngico, gálico, ferúlico e caféico (Kil e Lee, 1987).

Análises de inibidores de *Parthenium Hysterophorus* L. revelaram que partenina, uma lactona sesquiterpênic e os ácidos fenólicos: cafeico, vanílico, ferúlico, clorogênico,

anísico, além de ác. fumárico, formaram um importante grupo de compostos solúveis em água envolvidos em alelopatia (Pandey, 1994).

Não se conhece com exatidão como esses produtos são formados na célula, porém a teoria mais aceita é que os compostos secundários são produzidos com finalidades específicas e que a sua síntese obedece às leis da genética (Swain, 1977).

## 2.8 Função e ação de aleloquímicos

Na natureza, o processo alelopático está constantemente presente, tanto no reino animal como vegetal, entretanto, é nas plantas que os compostos se encontram com maior frequência e em maior número (Almeida, 1988).

Segundo Lovett (1986), as plantas apesar de possuírem a vantagem de serem autotróficas, são imóveis não podendo escapar ao ataque de seus inimigos. É portanto compreensível que, com a escassez de outras alternativas, utilizem com maior intensidade que os animais a estratégia dos produtos químicos para sua defesa. Esta observação sugere que a função primordial dos aleloquímicos é de proteção.

Putnam e Duke (1978), sugerem que a ação de aleloquímicos não é muito específica e alguns autores acrescentam ainda que, espécies dicotiledôneas são mais afetadas do que monocotiledôneas (Einhellig e Leather, 1988; Heisey, 1996; Stevens Jr. e Tang, 1987). Em estudos realizados por Fischer; Weidenhamer e Bradow (1989), somente duas espécies monocotiledôneas foram significativamente afetadas por uma ou mais das lactonas sesquiterpênicas testadas sendo as outras sete espécies insensíveis.

Hipocótilos de dicotiledôneas foram aparentemente mais sensíveis ao L-triptofano, um aleloquímico encontrado em aveia (*Avena sativa* L.), do que coleótilos de monocotiledôneas (Noguchi-Kato; Mizutani e Hasegawa, 1994).

## 2.9 Modo de ação

Quanto ao modo de ação, os aleloquímicos atuam nas atividades vitais das plantas, ou seja, em processos relacionados ao crescimento (divisão celular, sínteses orgânicas, interações

com hormônios, efeitos na síntese ou ativação de enzimas); ao metabolismo respiratório; à fotossíntese (movimento estomatal, conteúdo de clorofila, área foliar, fotofosforilação, atividade da ATPase da membrana do cloroplasto) e à absorção de nutrientes (acumulação mineral, absorção de íons, efeitos nas membranas, efeito nas relações hídricas) (Rice, 1979; Einhellig, 1986; Almeida, 1988; Durigan e Almeida, 1993).

Segundo Einhellig (1986), para várias substâncias fenólicas o mecanismo de ação é na alteração dos níveis de ácido indol acético (AIA). Vaughan e Ord (1991), sugeriram que as concentrações de AIA, são influenciadas pelos ácidos benzóico e derivados do trans~cinâmico.

Reduções no crescimento de plântulas de soja (*Glycine max*) ocorreram quando estas foram cultivadas na presença de ácido salicílico. Segundo Barkosky e Einhellig (1993), o ácido salicílico causou um estresse de água crônico durante 28 dias de tratamento e este decréscimo no potencial hídrico pode ter resultado de uma redução na absorção de água pela raiz.

Diferentes compostos podem atuar sinergicamente e seus efeitos estão relacionados às condições ambientais. Plantas crescendo em condições subótimas de nutrientes, umidade e temperatura são mais sensíveis a aleloquímicos do que aquelas desenvolvidas sob condições não estressantes (Einhellig, 1986; Williansom, Obee e Weidenhamer, 1992 ).

Williansom, Obee e Weidenhamer (1992), relataram que o ácido hidrocínâmico um produto da hidrólise de ceratiolina produzido pela planta *Ceratiola ericóides* mostrou forte efeito inibitório na biomassa de raiz e parte aérea da gramínea *Schizachyrium scoparium*. Os autores observaram ainda, que os efeitos inibitórios foram intensificados pela redução (1/9 da concentração completa) nos níveis de nitrogênio e potássio nas soluções nutritivas em relação ao controle (81ppm de N, 9 ppm de P, 78 ppm de K), sendo que, reduções nos níveis de fósforo e fósforo-potássio não tiveram efeitos significativos na intensificação.

De maneira geral, os sintomas de fitotoxicidade manifestados pelas plantas variam desde a inibição parcial ou total da germinação das sementes e danos no sistema radicular, desorganização no mecanismo de absorção de nutrientes, clorose e necrose, levando a morte da planta (Patrick, 1971).

Uma mistura glicosídica isolada de *Ipomoea tricolor* inibiu o comprimento da radícula e reduziu em 30 % a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de *E. crusgalli*. Este resultado indica, que é possível que o mecanismo de ação desse aleloquímico seja na inibição da atividade desta enzima

da membrana plasmática, uma vez que, a mesma está relacionada com alongamento celular e nutrição, os quais são processos essenciais ao crescimento (Calera, Anaya e Ruiz, 1995). Entretanto, devido à diferenças quantitativas nos resultados de inibição de radícula e inibição da atividade da enzima, os autores sugeriram que o aleloquímico interferiu ainda com outros processos celulares.

Chen e Leather (1990), sugeriram que o sítio de atividade da artemisina, uma lactona sesquiterpênica produzida por folhas de *Artemisia annua* L. foi a membrana plasmática.

Fischer, Weidenhamer e Bradow (1989), sugeriram que as lactonas sesquiterpênicas encontradas em seus estudos, podem agir como reguladores de crescimento, estimulando ou inibindo o crescimento de radículas e inibindo a germinação de sementes.

Extrato aquoso de *Ruta Graveolens* L. foi testado para sua atividade alelopática *in vitro* na germinação e crescimento da radícula de rabanete (*Raphanus sativus* cv. Snowbelle) na luz e no escuro. Ocorreu queda na taxa de germinação de 40 % na luz, sendo que a fotoinibição foi acompanhada por uma inibição na absorção de água da semente. A uma dada concentração o inibidor mais potente foi a cumarina 5-metoxipsoraleno (5-MOP).

Observações a nível celular de sementes de rabanete tratadas com 5-MOP, revelaram que células da camada de aleurona assemelharam-se àquelas de sementes secas quiescentes, diferentes do controle as quais apresentaram-se saudáveis (presença do núcleo, retículo endoplasmático rugoso, plastídeo, plasmodesmata, corpos proteicos e gotas lipídicas).

Os autores sugeriram que 5-MOP na presença de luz propiciou, direta ou indiretamente, um sinal crítico que inibiu, a absorção de água pela semente, expansão da epiderme do tegumento, bem como das células da camada de aleurona e processos relacionados ao crescimento do embrião (Aliotta et al., 1994).

Chen e Leather (1990), observaram que 10 $\mu$ M de artemisina, inibiram significativamente a produção de folhas em *Lemna minor* e *Lemna obscura* e ainda a síntese de clorofila em *L. minor* e conteúdo de antocianina em *L. obscura*.

Einhellig e Rasmussen (1979), sugeriram que a redução na concentração de clorofila foliar, pode ter sido responsável pela redução no crescimento de plantas de soja tratadas com ácidos fenólicos. Visto que, o conteúdo de clorofila está estritamente correlacionado com a produção vegetal, qualquer redução na clorofila foliar poderia limitar a fotossíntese líquida e

consequentemente o crescimento total da planta. Não foi possível entretanto estabelecer se a redução no conteúdo de clorofila foi devido a degradação ou diminuição da sua biossíntese.

Num estudo que objetivou avaliar os impactos da juglona, um aleloquímico produzido por *Juglans nigra* (L.), observou-se que além de efeitos indiretos na fotossíntese tais como: interferências no conteúdo de clorofila, movimentos estomatais ou nas relações hídricas ocorreram também efeitos diretos no mecanismo fotossintético e no metabolismo de energia. Dados espectrofotométricos propiciaram evidências de que a juglona não bloqueia o fluxo de elétrons ao longo dos citocromos mas parece propiciar uma via alternativa para os elétrons reduzirem o O<sub>2</sub> (Hejl, Einhellig e Rasmussen, 1993).

Por outro lado, Rasmussen et al., (1992), demonstraram que o sorgoleone, um exsudato da raiz de sorgo (*Sorghum bicolor*) recentemente relatado, é um potente inibidor da respiração em mitocôndrias isoladas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*). Entretanto dados espectrofotométricos sugeriram que um mecanismo de inibição do sorgoleone é bloquear o fluxo de elétrons entre o complexo citocromo b e c<sub>1</sub> na cadeia de transporte de elétrons.

Efeitos dos ácidos trans-cinâmico e benzóico isolados de *Elytrigia repens* (L.), foram observados na inibição da formação de raízes laterais, absorção de nutrientes e sua translocação, conteúdo de clorofila e consequentemente redução no peso seco de raiz e parte aérea de plantas de soja (*Glycine max* L.). Com relação à composição mineral, raízes de plantas crescidas na presença de ácido benzóico ou trans-cinâmico tiveram quantidades baixas de P, K, Mg, Mn, Cl<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e altas de Zn e Fe quando comparadas à plantas não tratadas. Observou-se ainda acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Baziramakenga, Simard e Leurox, 1994). A parte aérea das plantas crescidas na presença dos aleloquímicos mostraram maior acúmulo de Ca, Mg e Zn, entretanto os conteúdos de P e Fe foram reduzidos.

Esses autores sugeriram que processos tais como, divisão celular, balanço hormonal, polaridade das membranas, atividade da redutase do nitrato, degradação ou biossíntese de clorofila e fotossíntese podem ter sido afetados.

## 2.10 Dinâmica de aleloquímicos na natureza

O fato de que um composto fitotóxico é isolado e identificado, não implica necessariamente que ele esteja envolvido em alelopatia. Os compostos fenólicos por exemplo, possuem uma dinâmica muito complexa, desse modo sua disponibilidade e atividade dependem do solo e condições ambientais. Ao entrarem na solução do solo, os fenólicos são adsorvidos quase imediatamente pela matéria orgânica e frações coloidais minerais. Evidências indicam que eles estão no solo preferencialmente na forma conjugada do que forma livre (Siqueira et al., 1991).

Em solos arenosos estão sujeitos à lixiviação, sendo a retenção favorecida pela matéria orgânica e acidez do solo (Siqueira et al., 1991). Por outro lado moléculas livres na solução estão em íntimo contato com organismos vivos e raízes de plantas e por esta razão podem influenciar seu crescimento e atividade.

Rice (1984), cita que isoflavonóides liberados por folhas e caules de trevo vermelho (*T. pratense* L.), decompõem-se em compostos fenólicos no solo e exibem efeitos no seu próprio crescimento (autoalelopatia).

Por outro lado, as concentrações das antraquinonas emodina, fisciona e seus derivados glicosídeos isolados de *Polygonum sachalinense* encontradas no solo indicaram que esses compostos são os responsáveis pela inibição do crescimento de plântulas de alface (Inoue et al., 1992).

Os autores sugeriram que glicosídeos emodina-1-O- $\beta$ -D-glicosídeo e fisciona-1-O- $\beta$ -D-glicosídeo que não exibem atividade inibitória são liberados do rizoma de *P. sachalinense* e então decompostos nas formas ativas: emodina e fisciona, respectivamente, as quais subsequentemente exibem atividades inibitórias contra outras espécies.

Williansom, Obee e Weidenhamer (1992), encontraram que no solo a taxa de formação do ácido hidrocínâmico (um produto de hidrólise de ceratiolina), o qual apresenta atividade alelopática em laboratório, foi maior que a sua taxa de degradação em acetofenona (degradação microbiana).

Outro aspecto que deve ser considerado, é que a produção e liberação de aleloquímicos pelas plantas, torna-se maior à partir do momento em que estas passam a sentir os efeitos de estresses, seja por água, nutrientes, luz, espaço físico, ou até mesmo a exposição a herbicidas e ataque de microorganismos (Einhellig, 1989).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo - SP, no período de agosto/1995 à maio/1996.

#### **3.1 Coleta e preparo do material vegetal**

Folhas adultas de eupatório foram coletadas de plantas em estágio vegetativo, encontradas no cerrado da Reserva Ecológica e Experimental de Moji-Guaçu, SP em março de 1995.

As mesmas foram colocadas para secar à sombra e posteriormente, em estufa com circulação forçada de ar com temperatura regulada para 50° C, até que atingissem peso constante ao longo do tempo. Após completada a secagem, realizou-se trituração com o auxílio de um multiprocessador Arno.

#### **3.2 Testes químicos**

##### **3.2.1 Preparação do extrato CM (clorofórmio:metanol 2:1) e aplicação em cromatografia em camada delgada (CCD)**

As folhas de eupatório moídas (462,2 g), foram submetidas a extração exaustiva à frio em clorofórmio:metanol 2:1. A solução obtida foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida à 40°C e em seguida em banho maria sob ventilação, até completa evaporação do solvente.

O extrato CM, foi dissolvido em clorofórmio:metanol 2:1 de modo a se obter uma concentração igual a 1% e aplicado em placas de sílica gel G tipo 60-Merck. O desenvolvimento cromatográfico procedeu-se de forma unidimensional e ascendente em várias misturas de solventes, tais como, benzeno : acetona (4:1); benzeno : clorofórmio (1:1); tolueno : acetona (4:1); tolueno:acetona (70:30); tolueno:acetona (60:40); hexano:acetato de etila (4:1); hexano:acetato de etila (6:4); hexano: acetato de etila (1:1); clorofórmio:metanol (98:2); clorofórmio:metanol (95:5).

Cada cromatoplaça foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e revelada através de exposição da cromatoplaça a vapores de iodo contidos em recipientes fechados.

### **3.2.2 Fracionamento do extrato CM em coluna de sílica gel**

O extrato CM (5g), foi submetido a uma coluna cromatográfica (comprimento = 46,5 cm e diâmetro interno de 5 cm) em silicagel 60, 70-230 mesh, Merck, (200 g) eluída inicialmente num sistema de solventes consistindo de tolueno:acetona em polaridades crescentes (tolueno: acetona 95:5; 90:10; 85:25; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50), seguido de mistura de clorofórmio:metanol 90:10 e finalmente metanol.

Coletou-se frações de 50 ml, sendo que cada uma delas após evaporação dos solventes em evaporador rotatório sob pressão reduzida, foi monitorada em CCD (silicagel G tipo 60), utilizando-se diferentes proporções de fases móveis (tolueno:acetona 4:1; 7:3; 3:2; 1:1; 2:3 e 3:7) de acordo com a polaridade das substâncias presentes em cada fração.

As frações cujas manchas em CCD, apresentaram valores de  $R_f$  semelhantes quando observadas sob luz UV e reveladas em vapores de iodo foram reunidas, obtendo-se 24 frações.

Posteriormente, estas frações (exceto 5, 7, 18), foram testadas na germinação de sementes e crescimento da radícula de plântulas de alface (item 3.3.2).

Quinze das 24 frações apresentaram atividade biológica significativa na germinação e crescimento de radícula de plântulas de alface, das quais as frações 4, 6, 12, enumeradas de acordo com ordem de eluição na coluna foram novamente submetidas ao

fracionamento cromatográfico em coluna (altura de 46,5 cm e diâmetro de 1,1 cm) de silicagel flash-Merck (10g).

A fração 4 (44,6 mg) foi eluída em tolueno:acetona 4:1. Coletou-se 30 frações de 1mL as quais após evaporação do solvente foram monitoradas através de CCD (silicagel GF<sub>254</sub>; fase móvel = tolueno:acetona 65:35), resultando nos resíduos 4.1, 4.2.

A fração 6 (385,2 mg) foi eluída em tolueno:acetona 4:1 e acetona. Coletou-se 54 frações de 1 mL correspondente à eluição com a mistura de solventes e quatro frações de 15 mL correspondente à eluição com acetona. Realizou-se o monitoramento através de CCD (silicagel GF<sub>254</sub>; fase móvel = tolueno:acetona 65:35) e os resíduos resultantes foram: 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7.

A fração 12 (76,7 mg) foi eluída em tolueno:acetona 1:1, 3:7 e acetona. Coletou-se 57 frações de 1mL, correspondente à eluição com tolueno:acetona 1:1, quatro frações de 1mL correspondente à eluição com tolueno:acetona 3:7 e uma única fração de 25 mL correspondente à eluição com acetona. Estas frações foram monitoradas através de CCD (Silicagel GF<sub>254</sub>, fase móvel = tolueno:acetona 75:25) resultando nos resíduos 12.1, 12.2, 12.3.

### 3.2.3 Identificação e determinação estrutural das substâncias purificadas

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN<sup>1</sup>H) e carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) foram registrados em espectrômetros Bruker AC 200 operando a 200,13 e 50,3 MHz respectivamente. Utilizou-se CDCl<sub>3</sub> (clorofórmio deuterado - 99,8%) da Merck, como solvente e TMS (tetrametilsilano) como padrão de referência.

Os espectros de massa, foram obtidos em espectrômetro VG-Faison plataforma 2, através de inserção direta da amostra e na ionização química utilizou-se gás ionizante.

Os espectros no infravermelho foram registrados no espectrômetro da Perkin Elmer, modelo FT-IR 1750, utilizando-se pastilhas de KBr como suporte.

### 3.3 Testes biológicos

#### 3.3.1 Bioensaios para avaliação dos efeitos do extrato CM nas espécies teste

Para realização deste experimento levou-se em consideração os resultados obtidos em ensaio de germinação preliminar. As espécies teste utilizadas (arroz, feijão, milho, alface, caruru e picão preto), foram aquelas que apresentaram taxas de germinação maior que 80 %, não apresentaram problemas com fungos e germinaram no período de 7 dias.

Procurou-se então evitar espécies cujas sementes apresentavam dormência, baixas porcentagens e velocidade de germinação ou altamente atacadas por fungos.

##### 3.3.1.1 Efeitos na germinação

O extrato CM (150 mg), foi ressuspenso em mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (150 mL), resultando numa solução com concentração igual a 10 mg/mL.

Aplicou-se 2 mL e 7mL deste extrato em placas de Petri de 4,5 cm e 9 cm de diâmetro, respectivamente, forradas com duas folhas de papel de filtro (Caal com 3  $\mu$ ). Os tratamentos controle consistiram em placas contendo somente água destilada.

As placas foram deixadas abertas durante 7 dias em condições ambiente para evaporação dos solventes.

Após este período as sementes de alface, caruru e picão preto foram colocadas em placas de diâmetros menores e as de arroz, milho e feijão foram colocadas em placas de diâmetros maiores. Acrescentou-se 2mL e 7mL de água destilada respectivamente.

As placas foram então levadas para estufas incubadoras BOD FANEM modelo 347 F.G, com intensidade luminosa de  $437\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , temperatura regulada para 30/20°C (temperatura alternada) e fotoperíodo de 12 h. Somente as placas que continham sementes de alface foram colocadas em estufas de 25°C e luz constante.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (6x2), sendo 6 espécies e ausência e presença do extrato CM, cada parcela constituiu-se em uma

placa com 50 sementes e o número de repetições foi igual a cinco. Somente para o milho foram semeadas 25 sementes por placa e o número de repetições foi igual a dez.

A duração do ensaio foi de sete dias, sendo que diariamente após 24 h da instalação, as sementes consideradas germinadas, aquelas que apresentavam protusão da radícula, foram contadas e removidas das placas. A partir dos dados obtidos foram calculados (Labouriau, 1983):

- Porcentagem de germinação

$$G = 100 * \Sigma n_i / N$$

- Tempo médio de germinação

$$\bar{t} = \Sigma(\bar{t}_i * n_i) / \Sigma n_i$$

- Intervalo de Confiança para o tempo médio

$$\bar{t} = \bar{t}_{0,95}^{gl} * s \bar{t}$$

$n_i$  = Número de sementes germinadas no iésimo dia

$t_i$  = Tempo em dias para germinação

$N$  = Número total de sementes colocadas para germinar

$\bar{t}$  = Tempo médio de germinação

$s$  = Desvio padrão da média

$gl$  = Grau de liberdade

### 3.3.1.2 Efeitos no comprimento da radícula e parte aérea

Para avaliar o efeito do extrato CM sobre o comprimento da radícula e parte aérea (cm) de feijão, milho, arroz e alface, visto que, caruru e picão preto tiveram 100% de inibição da germinação no experimento anterior, foi realizado outro bioensaio com as mesmas condições experimentais descritas anteriormente, porém, o número de sementes por placa foi igual a 10.

As avaliações no crescimento foram feitas cinco dias após instalação do experimento para as plântulas de milho, arroz e alface. Para o feijão foram realizadas somente medições no comprimento da radícula uma vez que os hipocótilos, epicótilos ou demais estruturas aéreas não se desenvolveram no período considerado em placas de Petri contendo o extrato CM.

### **3.3.2 Efeito das frações do extrato CM na germinação de sementes e crescimento de radícula de plântulas de alface.**

Soluções das frações na concentração de 10 mg/mL, foram preparadas utilizando-se como solventes diferentes proporções de tolueno:acetona, de acordo com a solubilidade das substâncias presentes em cada fração.

Em seguida, aplicou-se 2 mL de cada fração em placas de Petri de 4.5 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel de filtro (Caal com porosidade de 3 $\mu$ ). Os tratamentos controle consistiram em placas contendo somente água destilada.

Posteriormente, as placas foram deixadas abertas durante 7 dias em condições ambiente para evaporação dos solventes e decorrido este período, foram colocadas as sementes de alface juntamente com 2 mL de água destilada.

As placas foram então levadas para estufas incubadoras BOD FANEM modelo 347 F.G, com intensidade luminosa de 437 $\mu$ W $\cdot$ cm<sup>-2</sup>, temperatura de 25°C e luz constante.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), cada parcela constituiu-se em uma placa com 50 sementes e o número de repetições foi variável de três à duas, para frações com maiores pesos ou somente uma placa, para aquelas com pequena quantidade de materiais.

A duração do ensaio foi de três dias, sendo que diariamente após 24 h da instalação, as sementes consideradas germinadas, aquelas que apresentavam protusão da radícula foram contadas e mantidas nas placas. No último dia foi realizada a medição do comprimento da radícula (cm). A partir dos dados obtidos foi calculada (Labouriau, 1983):

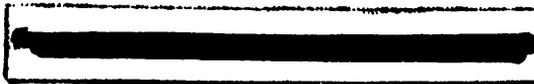
- Porcentagem de germinação

$$G = 100 * \sum n_i / N$$

### 3.4 Análise estatística

Os dados de porcentagem de germinação do primeiro bioensaio (utilizando o extrato CM) foram transformados em valores angulares (arco seno da raiz da porcentagem) e juntamente com os dados de comprimento de radícula e parte aérea das plântulas, foram submetidos a análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste Tukey (Gomes, 1987)

Para análise dos dados do bioensaio realizado para verificar o efeito do extrato CM após fracionamento, os dados de porcentagem de germinação foram igualmente submetidos à transformação (arco seno raiz da porcentagem) e juntamente com os dados de comprimento de radícula foram submetidos ao agrupamento univariado de Scott e Knott (1974),



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Testes químicos

#### 4.1.1 Resultado da cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato CM

Um esquema da cromatoplaça do extrato CM de folhas de eupatório desenvolvida em mistura de tolueno:acetona (4:1) bem como os valores de  $R_f$  das manchas detectadas é mostrado na Figura 1.

Observou-se que a mistura de solventes, tolueno:acetona 4:1 propiciou a melhor resolução do cromatograma, sendo detectados pelo menos 9 constituintes sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm) e exposição a vapores de iodo.

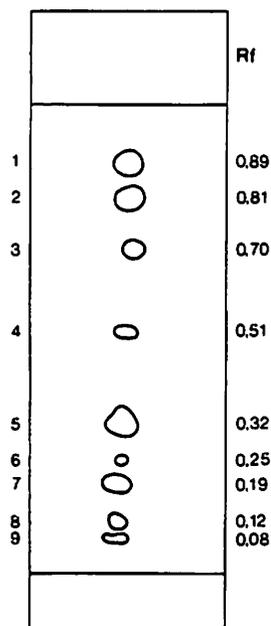


FIGURA 1. Esquema da cromatoplaça do extrato CM de folhas de eupatório desenvolvida em tolueno:acetona 4:1, observada sob luz UV e revelada com vapores de iodo. UFLA, Lavras - MG, 1996.

#### 4.1.2 Fracionamento cromatográfico do extrato CM em coluna de silicagel

O fracionamento cromatográfico do extrato CM de folhas de eupatório em coluna de sílica gel, resultou na obtenção de 24 frações, conforme é apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Frações do extrato CM submetido à cromatografia em coluna de silicagel eluída com solventes de polaridades crescentes. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FRAÇÕES	PESO (mg)	ELUENTES
1	35,2	Tolueno:acetona 95:5
2	247,3	Tolueno:acetona 95:5
3	428,9	Tolueno:acetona 95:5
4	100,5	Tolueno:acetona 95:5
5	39,3	Tolueno:acetona 95:5
6	454,5	Tolueno:acetona 90:10
7	33,2	Tolueno:acetona 90:10
8	24,4	Tolueno:acetona 90:10
9	258,7	Tolueno:acetona 90:10
10	385,6	Tolueno:acetona 90:10
11	81,12	Tolueno:acetona 90:10
12	138,5	Tolueno:acetona 85:15
13	51,5	Tolueno:acetona 85:15
14	235,2	*
15	89,7	Tolueno:acetona 60:40
16	99,9	Tolueno:acetona 50:50
17	258,8	Tolueno:acetona 50:50
18	4,2	Clorofórmio:metanol 90:10
19	10,2	Clorofórmio:metanol 90:10
20	48,5	Metanol
21	634,4	Metanol
22	316,7	Metanol
23	241,5	Metanol
24	74,3	Metanol

\* Fração onde foram reunidos os materiais eluídos em tolueno:acetona 85:15; 80:20 e 70:30.

Através de CCD, verificou-se que nas frações 8 e 10, uma única mancha foi detectada (Figura 2). Essas substâncias apresentaram valores idênticos de  $R_f$  em diferentes proporções de solventes (tolueno acetona 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50), sendo que, na Tabela 2 esses valores são mostrados apenas para o desenvolvimento em tolueno:acetona 85:15. Na fração 10, após evaporação do solvente usado para sua eluição ocorreu a formação de

cristais brancos, sendo a fluorescência da substância quando observada sob luz UV mais intensa. Esta substância foi designada Em-1.

Na fração 11 duas manchas foram detectadas: 11.1 e 11.2, sendo que, 11.1 apresentou mesmo valor de  $R_f$  e padrão de fluorescência que Em-1. Para 11.2, o valor de  $R_f$  foi mais baixo (substância mais polar) e sua cor quando observada sob luz UV foi azul royal.



FIGURA 2. Cromatoplaca das frações 8, 10 e 11 (da esquerda para direita) desenvolvida em tolueno:acetona 85:15 e observada sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996.

TABELA 2. Cor e valores de  $R_f$  das substâncias presentes nas frações 8, 10 e 11 após CCD (sílica gel G tipo 60, fase móvel = tolueno:acetona 85:15) e observação sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FRAÇÃO	$R_f$	COR
8	0,33	azul claro
10	0,33	azul muito fluorescente
11.1	0,33	azul muito fluorescente
11.2	0,27	azul royal

As frações 4, 6 e 12 apresentaram-se impuras após realização de CCD e por esta razão foram novamente submetidas à cromatografia em coluna (item 3.2.2) (Figura 3).

A fração 4.2 obtida do fracionamento cromatográfico da fração 4 do extrato CM foi detectada através de luz UV em estado puro, enquanto a fração 4.1 apresentou uma mistura de pelo menos 5 componentes.

As frações 6.5 e 6.6, obtidas do fracionamento cromatográfico da fração 6 do extrato CM, foram visualizadas através de luz UV em estado puro, sendo 6.5 designada Em-2, enquanto que as demais estavam impuras (6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.7).

A fração 12.1 obtida do fracionamento da fração 12 do extrato CM é detectada através de luz UV em estado puro, apresenta mesmo valor de  $R_f$  e fluorescência que Em-1. Dois constituintes são detectados no resíduo 12.2, sendo idênticos àqueles encontrados na fração 11. No resíduo 12.3 os componentes **a** e **b** foram também idênticos àqueles encontrados na fração 11 e os componentes **c** e **d**, apresentaram valores de  $R_f$  mais baixos sendo portanto substâncias mais polares. Apesar do desenvolvimento em diferentes proporções de solventes (tolueno:acetona 4:1, 6:4, 7:3, 75:25, 73:27 e 77:23), não foi possível separá-los.

As frações 4.2 e 6.6 estão em fase de determinação estrutural, enquanto outras não foram trabalhadas por diversos fatores, tais como, pequena quantidade de materiais obtidos (fração 18), por terem sido utilizadas nos testes biológicos (frações 1, 8, 13, 15, 16, 19, 20, 24) ou ainda serão estudadas posteriormente.

A fração 21 foi submetida a uma série de CCD desenvolvidas em diferentes sistemas de solventes, observadas sob luz UV, reveladas com vapores de iodo e através de aspersão com ácido sulfúrico (10%). Utilizou-se também cromatografia em papel desenvolvida em ácido acético 15% e BAW (*n* butanol:ácido acético:água 4:1:1). Nenhuma das cromatoplasmas obtidas mostrou boa resolução, apresentando rastros e misturas complexas de vários constituintes (dados não mostrados).

Atribuiu-se a esse fato, a natureza altamente polar do material e posteriormente a fração será submetida a outros tipos de análises.

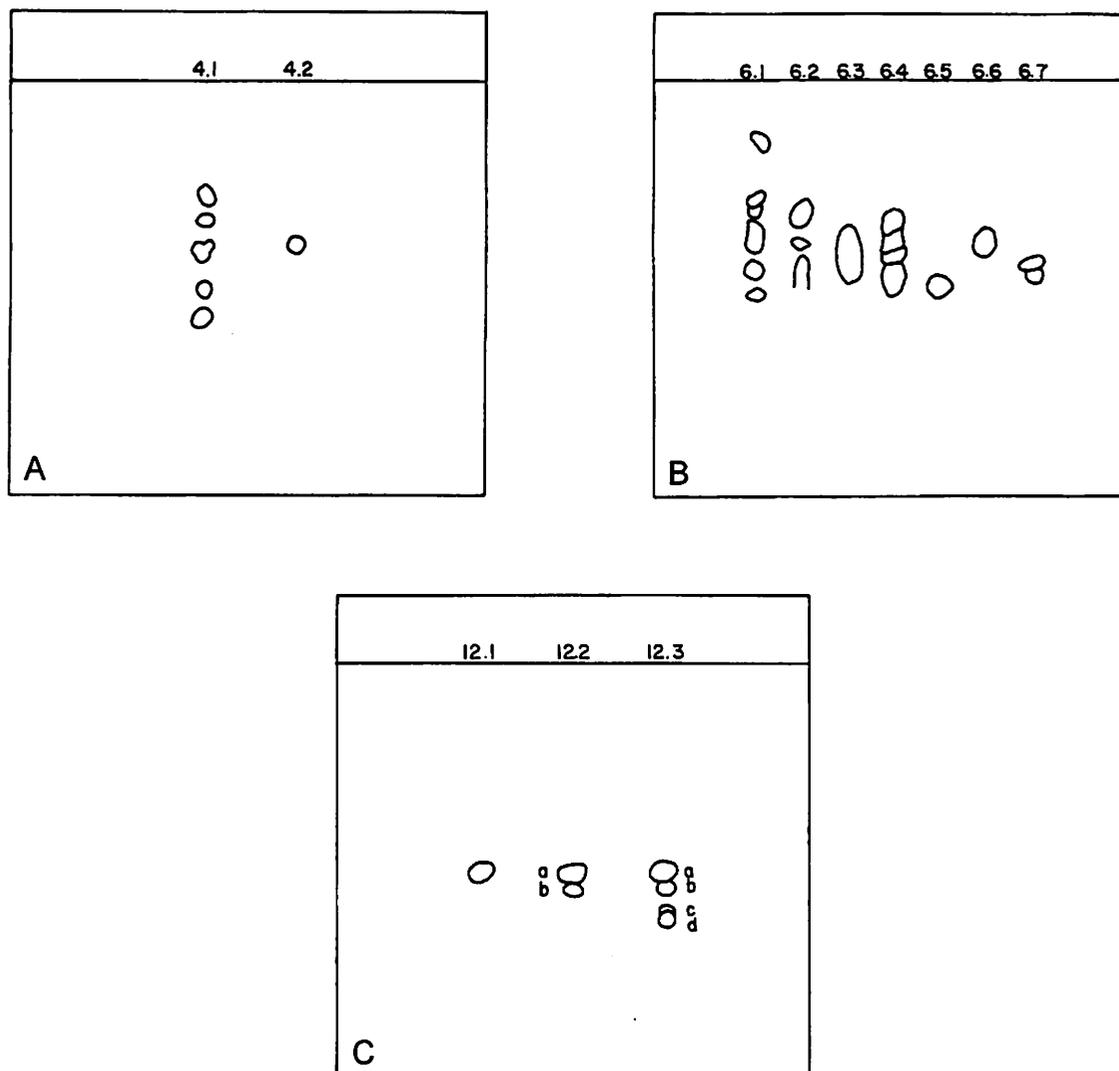


FIGURA 3. Cromatoplas das frações 4 (A), 6 (B) e 12 (c) após 2º fracionamento em coluna de sílicagel e realização de CCD (sílicagel GF<sub>254</sub>, fase móvel = tolueno:acetona 65:35, para A e B e tolueno:acetona 80:20 para C) e observação sob luz UV. UFLA, Lavras - MG, 1996.

#### 4.1.3 Identificação estrutural das substâncias purificadas, Em-1 e Em-2.

A substância Em-1, obtida da fração 10 do extrato CM apresentou a fórmula molecular  $C_{21}H_{22}O_8$ , segundo análises de seus dados espectroscópicos (EM, IV, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C), correspondendo à 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (Figura 4).

A substância Em-2, obtida da fração 6.5 apresentou a fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_8$ , segundo análises de seus dados espectroscópicos (EM, IV, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C), correspondendo

à 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavanona (Figura 4), a qual parece se tratar de uma substância inédita, ainda não relatada na literatura.

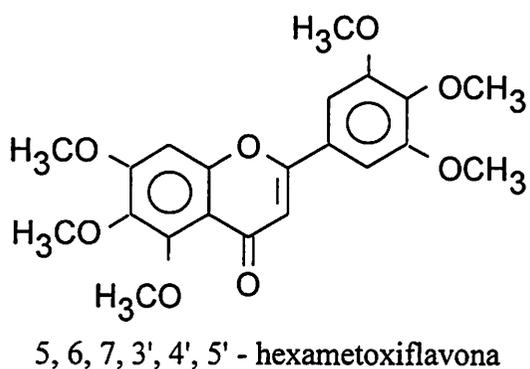
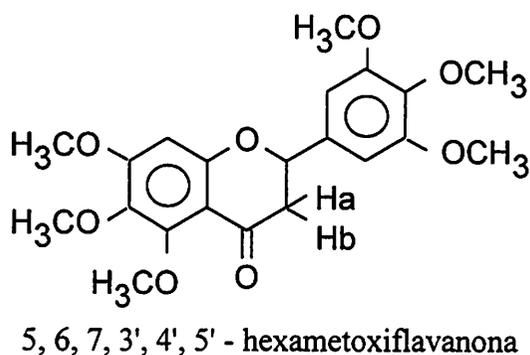


FIGURA 4. Substâncias identificadas do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad. UFLA, Lavras - MG, 1996.

#### 4.1.3.1 Dados espectroscópicos

- **Em-1**: Cristais incolores,  $C_{21}H_{22}O_8$ , M 402.  $\nu_{\max}^{KBr}$  ( $cm^{-1}$ ): 3655 - 3279 (OH), 1645 (C=C-C=O), 1602, 1581, 1546, 1505, 866, 840. (C=C aromático). EM m/z (intensidade relativa %): 403,6 (100,0)  $[M + H]^+$ ; 402,5 (21,35)  $[M]^+$ ; 387,5 (25,10)  $[M-CH_3]^+$ . RMN<sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7,08 (s, 2H, H-2' e 6'); 6,82 (s, 1H, H-8); 6,61 (s, 1H, H-3); 4,01 (s, 3H); 4,00 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,96 (s, 6H, 2x ( $OCH_3$ )); 3,93 (s, 6H, 2x ( $OCH_3$ )). RMN<sup>13</sup>C (veja Tabela 3).

- **Em-2**:  $C_{21}H_{24}O_8$ , M 404.  $\nu_{\max}^{KBr}$  ( $cm^{-1}$ ): 3589-3280 (OH), 1684 (C=O), 1601, 1566, 1510, 886 e 849 (C=C aromático). EM m/z (intensidade relativa %): 405,6 (100,0)  $[M + H]^+$ ; 404.5 (46,62)  $[M]^+$ ; 375.5 (16,89)  $[M-HCO]^+$ . RMN<sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6,60 (s, 2H, H-2'e 6'); 6,29 (s, 1H, H-8); 5,25 (dd, J=12,7 e 3,0 Hz, H-2); 3,88 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,81 (s, 6H, 2x ( $OCH_3$ )); 3,80 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,78 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,75 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 2,95 (dd, J=12,7 e 16,7 Hz, 1H, H-3a); 2,69 (dd, 1H, J 16,7 e 3,0, H-3b). RMN<sup>13</sup>C (veja Tabela 3).

TABELA 3. Deslocamentos químicos de  $^{13}C$  ( $\delta$  em  $CDCl_3$ ) para Em-1 e Em-2 comparados com os dados registrados na literatura para as substâncias 1<sup>1</sup> e 2<sup>2</sup>. UFLA, Lavras - MG, 1996.

CARBONO	Em-1	Ref. 1	Em-2
2	161,01	160.90 s	78,70
3	108,25	108.20 d	45,74
4	177,18	177.00 s	189,31
5	154,55	154.50 s	159,62
6	140,42	140.40 s	138,23
7	157,80	157.70 s	160,45
8	96,32	96.10 d	96,44
9	152,50	152..60 s	159,53
10	112,77	112.90 s	103,23
1'	126,85	126.80 s	134,23
2'	103,34	103.50 d	103,23
3'	153,55	153.50 d	153,55
4'	140,88	141.00 s	138,23
5'	153,55	153.50 s	153,55
6'	103,34	163.50 d	103,23
$OCH_3$ (C-5)	61,55	61.50 q	61,65
$OCH_3$ (C-4')	62,20	62.10 q	60,87
$OCH_3$ (C-6)	61,04	61.00 q	61,38
$OCH_3$ (C-7)	56,38	56.40 q	56,20
$OCH_3$ (C-5')	56,38	56.40 q	56,21
$OCH_3$ (C-3)	56,38	56.30 q	56,21

Ref 1: Kinoshita e Firman, 1996.

## 4.2 Testes biológicos

### 4.2.1 Bioensaios para avaliação dos efeitos do extrato CM nas espécies teste

#### 4.2.1.1 Efeitos na germinação

Os resultados de porcentagem e tempo médio de germinação encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4. Porcentagem e tempo médio de germinação de espécies cultivadas e daninhas na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório.UFLA, Lavras - MG, 1996.

ESPÉCIE	GERMINAÇÃO (%)		TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO + IC	
	Controle	Extrato	Controle	Extrato
Feijão	96.4 <sup>a</sup>	97.2 <sup>a</sup>	1	1
Milho	94.4 <sup>a</sup>	95.2 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.0806	1.97 ± 0.054
Arroz	94.4 <sup>a</sup>	90.4 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.0186	1.09 ± 0.0489
Alface	94.0 <sup>a</sup>	42.0 <sup>b</sup>	1	1
Picão Preto	85.6 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	2.42 ± 0.1358	
Caruru	78.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.135	

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

IC = Intervalo de Confiança para o tempo médio de germinação ( $P < 0,05$ ).

Extrato CM de folhas de eupatório na concentração igual a 10 mg/mL, não apresentou efeitos inibitórios significativos na germinação de sementes de feijão, milho e arroz, sendo que para o feijão e milho a germinação foi estimulada em aproximadamente 0,8 % (valor estatisticamente não significativo), em relação ao tratamento controle.

No caso das espécies, alface, caruru e picão preto ocorreram diferenças significativas na porcentagem de germinação quando havia a presença do extrato nas placas de Petri. A germinação das sementes de alface foram inibidas em aproximadamente 55% e as sementes de caruru e picão preto tiveram inibição de 100%.

Os tempos médios de germinação das sementes de milho e arroz foram ligeiramente maiores nas placas contendo o extrato CM, o que expressa uma diminuição na

velocidade de germinação nos lotes tratados. Porém, isso só ocorreu nas fases iniciais do processo, pois a porcentagem final de germinação foi praticamente igual nos lotes tratados e controle (Tabela 4). Para alface e feijão os tempos médios de germinação permaneceram constantes.

Observando o intervalo de confiança desses dados pode-se inferir que diferenças significativas provavelmente ocorram no tempo médio de germinação do arroz, uma vez que seus intervalos de confiança não se sobrepõe.

#### 4.2.1.2 Efeitos no comprimento da radícula e parte aérea

Os efeitos do extrato CM no crescimento de radícula e parte aérea das plântulas ensaiadas encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5. Comprimento de radícula e/ou parte aérea (cm) de plântulas de milho, arroz, alface na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório.UFLA, Lavras - MG, 1996.

ESPÉCIE	COMPRIMENTO DA RADÍCULA (cm)		COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA (cm)	
	Controle	Extrato	Controle	Extrato
Feijão	6.8356 <sup>a</sup>	2.5483 <sup>b</sup>		
Arroz	4.7127 <sup>a</sup>	0.7681 <sup>b</sup>	2.6525 <sup>a</sup>	0.6703 <sup>a</sup>
Milho	4.0693 <sup>a</sup>	2.4506 <sup>a</sup>	2.0645 <sup>a</sup>	1.8756 <sup>b</sup>
Alface	2.3193 <sup>a</sup>	0.4968 <sup>b</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.5164 <sup>b</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

Extrato de folhas de eupatório na concentração testada não causou reduções significativas no crescimento de radícula ou da parte aérea de plântulas de milho.

No caso de plântulas de feijão o comprimento da radícula foi reduzido significativamente em 63%. Seus hipocótilos e epicótilos não se desenvolveram, ou em algumas plântulas os hipocótilos apresentaram-se com desenvolvimento anormal (muito contorcidos) ao final dos cinco dias. As medições do comprimento da parte aérea não foram então realizadas.

Plântulas de arroz na presença do extrato, tiveram reduções significativas tanto no comprimento da radícula, quanto no comprimento da parte aérea. As porcentagens de inibição foram de 84 % e 75 % respectivamente, em relação ao tratamento controle.

O mesmo foi observado para plântulas de alface, onde tanto radícula quanto parte aérea foram também reduzidos significativamente. As porcentagens de inibição foram de 79 % para comprimento de radícula e 58% para parte aérea.

Efeitos de retardamento do desenvolvimento dos coleóptilos foram observados no caso de plântulas de arroz. No tratamento controle os coleóptilos iniciaram seu desenvolvimento no 2º dia após instalação do ensaio. Na presença do extrato, os coleóptilos só puderam ser visualizados no 3º dia após a instalação (observação visual). Esse efeito pode estar relacionado com o maior tempo médio de germinação das sementes de arroz quando na presença do extrato.

#### **4.2.2 Efeito do extrato CM após fracionamento, na germinação de sementes e crescimento de radícula de plântulas de alface**

Quanto aos efeitos na germinação das sementes de alface, as frações foram reunidas em seis grupos estatisticamente diferentes entre si (Tabela 6):

- Grupo I : constituído pelas frações 8, 20 e 21 as quais inibiram totalmente a germinação de sementes de alface após 24 h. No caso da fração 8, as sementes germinaram após 24 h, o que pode ser visualizado nos dados de medição do comprimento de radícula os quais foram realizados no 3º dia em placas contendo essas frações.

- Grupo II : constituído pela fração 6 que inibiu a germinação em 79 % em relação ao tratamento controle.

- Grupo III: constituído pela fração 17 que inibiu a germinação em 63 %

- Grupo IV: constituído pelas frações 4, 9, 13 e 15 nas quais a porcentagem de inibição da germinação variou de 42 à 48 % em relação ao tratamento controle.

- Grupo V : constituído pelas frações 1, 12, 14 e 19 nas quais a porcentagem de inibição da germinação variou de 24 à 34 % em relação ao tratamento controle.

- Grupo VI : constituído pelas frações 2, 3, 10, 11, 16, 22, 23, 24 que não foram significativamente diferentes do tratamento controle.

TABELA 6. Efeito do extrato CM após fracionamento em coluna de sílica gel na germinação de sementes e comprimento de radícula de plântulas de alface. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FRAÇÃO	GERMINAÇÃO (%)	COMPRIMENTO DE RADÍCULA (cm)
1	68,00 <sup>5</sup>	0,9529 <sup>1</sup>
2	92,67 <sup>6</sup>	0,9521 <sup>1</sup>
3	92,67 <sup>6</sup>	1,7270 <sup>2</sup>
4	54,67 <sup>4</sup>	0,4868 <sup>1</sup>
6	19,34 <sup>2</sup>	0,5419 <sup>1</sup>
8	0 <sup>1</sup>	0,1550 <sup>1</sup>
9	54,67 <sup>4</sup>	1,2071 <sup>2</sup>
10	95,34 <sup>6</sup>	2,6733 <sup>3</sup>
11	90,67 <sup>6</sup>	1,5174 <sup>2</sup>
12	70,00 <sup>5</sup>	0,3765 <sup>1</sup>
13	48,00 <sup>4</sup>	0,5304 <sup>1</sup>
14	71,34 <sup>5</sup>	1,0016 <sup>1</sup>
15	50,00 <sup>4</sup>	1,4956 <sup>2</sup>
16	88,67 <sup>6</sup>	1,4722 <sup>2</sup>
17	34,67 <sup>3</sup>	0,8897 <sup>1</sup>
19	62,00 <sup>5</sup>	1,0156 <sup>1</sup>
20	0 <sup>1</sup>	0,0445 <sup>1</sup>
21	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>
22	79,34 <sup>6</sup>	0,6898 <sup>1</sup>
23	82,67 <sup>6</sup>	0,8282 <sup>1</sup>
24	85,00 <sup>6</sup>	0,8897 <sup>1</sup>
Controle	93,78 <sup>6</sup>	1,9457 <sup>2</sup>

Médias seguidas pelo mesmo número na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Scott e Knott (1974).

Quanto aos efeitos no comprimento da radícula das plântulas de alface, as frações foram reunidas em apenas três grupos estatisticamente diferentes entre si (Tabela 6):

- Grupo I : constituído pelas frações 1,2, 4, 6, 8, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 nas quais a porcentagem de inibição do comprimento da radícula em relação ao tratamento controle variou de 48 % à 100 %.

- Grupo II : constituído pelas frações 3, 9, 11, 15, 16 às quais não diferiram estatisticamente do controle.

- Grupo III: constituído pela fração 10 a qual estimulou o crescimento da radícula em 37 %, porém convém ressaltar que as plântulas apresentaram-se com ausência de pêlos radiculares.

Sintomas visuais observados foram radículas engrossadas e curtas; enoveladas, necrosadas e curtas; extremamente afinadas e compridas.

Observou-se ainda que, as frações 4, 6 e 12, apresentaram efeitos visuais semelhantes àqueles observados quando as sementes de alface foram colocadas em placas de Petri contendo o extrato CM não fracionado, ou seja, as sementes germinavam mais lentamente e por ocasião da avaliação do comprimento da radícula estas mostravam-se curtas, amareladas ou necrosadas, ocasionado quase sempre a morte das plântulas.

## 5 DISCUSSÃO

Os dados experimentais suportam claramente o potencial alelopático de *Eupatorium maximiliani* Schrad em cinco das seis espécies testadas (arroz, milho, feijão, alface, caruru e picão preto). Extrato clorofórmio:metanol 2:1 de folhas de eupatório na concentração de 10 mg/mL, inibiu significativamente as taxas de germinação de sementes de alface, caruru e picão preto, sendo que para as duas últimas espécies a porcentagem de inibição foi de 100%. No caso de sementes de arroz, não ocorreu redução na taxa final de germinação em relação ao tratamento controle, porém a velocidade de germinação foi inicialmente afetada, o que foi verificado considerando-se uma queda no tempo médio de germinação das sementes colocadas em placas contendo o extrato CM.

O crescimento de radícula e parte aérea foram significativamente reduzidos no caso de plântulas de alface, feijão, arroz. Para o milho, nos 7 dias de duração do experimento não ocorreram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados.

Esses resultados estão de acordo com a hipótese de Putnam e Duke (1978), que afirmam que um composto que é tóxico para uma dada espécie pode ser inócuo para outra.

As espécies mais afetadas foram em ordem caruru = picão preto > alface > arroz > feijão. Para vários autores, espécies dicotiledôneas tendem a ser mais sensíveis à determinados aleloquímicos do que monocotiledôneas (Heisey, 1996; Noguchi-Kato, Mizutani e Hasegawa, 1994). Esses dados diferem entretanto, daqueles encontrados para aleloquímicos de folhas de eupatório, os quais afetaram tanto espécies monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Porém, uma predominância de efeitos desses aleloquímicos pareceu residir em espécies com sementes menores.

Nos trabalhos desenvolvidos por Stevens Jr.e Tang (1987), exsudatos radiculares de *Bidens pilosa* reduziram significativamente o crescimento das plântulas de alface, feijão, milho e sorgo (*Sorghum bicolor*). As quatro espécies variaram entretanto, com relação à sensibilidade aos exsudatos hidrofóbicos e as dicotiledôneas foram mais sensíveis do que as

monocotiledôneas. Ambas dicotiledôneas, alface e feijão, tiveram diferenças significativas ao nível de 0.01 em relação ao controle em cada dado amostrado. As duas monocotiledôneas, milho e sorgo não tiveram diferenças significativas entre tratamento e controle 5 dias após a semeadura, porém mostraram diferenças num estágio posterior do experimento.

Os autores sugeriram que a ausência de resposta do milho durante o desenvolvimento inicial da plântula pode ter sido devido à quantidade de reservas presentes no endosperma as quais poderiam ter propiciado nutrientes por um longo período de tempo, maior que para outras espécies. Atribuíram então ao processo de absorção de nutrientes o modo de ação desses aleloquímicos. Notou-se ainda que o sorgo que tem uma semente menor, repondeu menos que o feijão ou alface indicando a ausência de sensibilidade das duas monocotiledôneas.

Em adição aos efeitos na germinação e crescimento, plântulas expostas ao extrato de folhas de eupatório tiveram desenvolvimento anormal, foram geralmente menos vigorosas, apresentaram ausência de pêlos radiculares, necroses e cloroses no sistema radicular.

Ausência de pêlos radiculares em radícula de rabanete (*Raphanus sativus* cv. Snowbelle) pela ação de aleloquímicos de *Chenopodium album* foram também observados em trabalhos realizados por Malik, Puchala e Grosz (1994) e em estudos com outras espécies realizados por Medeiros (1989).

Jacobi e Ferreira (1991) e Paszkowski e Kremer (1988), notaram efeitos alelopáticos mais drásticos sobre o crescimento da plântula do que sobre a germinação em seus ensaios. Jacobi e Ferreira (1991), acrescentam ainda que, parte aérea e raízes exibem, respostas diferentes a aleloquímicos, o que foi verificado também nas plântulas das espécies testadas, tratadas com extrato de eupatório.

O efeito alelopático de *Eupatorium maximiliani* foi observado em várias frações resultantes do processo cromatográfico de fracionamento. Isto significa que esta atividade biológica é resultante da presença de várias e não de uma única substância. Vários autores concordam que, na natureza as interferências alelopáticas advém da ação combinada e não apenas de um único composto químico, sendo que, seu impacto é também influenciado pelas condições ambientais (Lodhi, Bilal e Malik, 1987; Einhellig e Leather, 1988; Lehman, Blum e Gerig, 1994).

Parece que tanto compostos polares quanto apolares estão envolvidos, uma vez que tanto as frações que eluíram primeiro na coluna (menos polares) quanto aquelas que foram

eluídas posteriormente (mais polares), mostraram efeitos inibitórios significativos nos bioensaios utilizando-se sementes de alface.

É interessante notar que a substância isolada, 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexametoxiflavona, causou efeito estimulatório no crescimento da radícula de alface quando testada isoladamente. Deve ser considerado entretanto, que a radícula dessas plântulas não apresentavam pêlos radiculares. De acordo com Riffle et al., (1990), é importante reconhecer as propriedades sinérgicas de alguns compostos, os quais individualmente podem ser fitotóxicos, não tóxicos ou estimulatórios.

Este efeito estimulatório da 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexametoxiflavona pode ter sido a causa da maior porcentagem de germinação do milho e feijão pelo extrato não purificado de folhas de eupatório. É provável que as concentrações deste composto neste extrato tenham sido suficientes para afetarem milho e feijão embora de forma não significativa.

A outra substância 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexametoxiflavanona, foi isolada da fração 6 a qual mostrou atividade inibitória, entretanto, outros constituintes estavam também presentes (Figura 4).

A 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavanona, parece tratar-se de uma substância inédita, uma vez que não foi encontrado registro sobre essa flavanona na literatura. A 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, entretanto, já foi encontrada em outras espécies de Asteraceae (Ashok e Newand, 1986).

A ação inibitória da fração 8 pode ter sido causada pelas substâncias alifáticas (Figura 1A) presentes nesta fração, uma vez que 5, 6, 7, 3', 4', 5'-hexametoxiflavona, a qual ocorreu em predominância nesta fração (mesma substância presente na fração 10) não apresenta efeitos inibitórios (Tabela 6).

Na fração 12 é possível que o efeito observado tenha sido ocasionado pela mistura de substâncias alifáticas presentes no resíduo 12.1, ou pelos resíduos 12.3 **c** e **d**, uma vez que os demais constituintes desta fração eram os mesmos encontrados na fração 10 e 11, os quais não mostraram atividades inibitórias na germinação ou crescimento de plântulas de alface (Tabela 6).

Convém ressaltar que efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos entre compostos ou aspectos relacionados à concentração de um dado composto presente em uma determinada fração podem ainda estar envolvidos. Existe então a necessidade de isolar cada componente e

testar sua ação e concentração de modo isolado e posteriormente em diferentes combinações com as demais substâncias.

Einhellig e Rasmussen (1979), encontraram ação sinérgica entre os ácidos vanílico e *p*-OH benzóico no crescimento do sorgo. Hartung, Nair e Putnam (1994), encontraram que, os ácidos, ferúlico, isoferúlico, málico, cítrico e fumárico isolados de raízes de *Asparagus officinalis* L. quando aplicados individualmente, não foram ativos o bastante para explicar o potencial aleloquímico do extrato aquoso. Os autores sugeriram que efeitos sinérgicos ou aditivos poderiam estar envolvidos.

As substâncias identificadas pertencem então à classe dos flavonóides, os quais formam o maior grupo dentro dos compostos fenólicos naturais.

Os flavonóides têm biogênese mista, ou seja o anel A é derivado de 3 unidades acetato condensadas cabeça a cauda, enquanto o anel B e os 3 carbonos do anel central são derivados do ácido cinâmico (Figura 5).

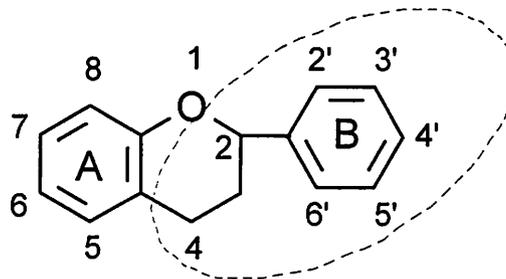


FIGURA 5. Estrutura básica de um flavonóide (Salisbury e Ross, 1991).

Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são na maior parte acumulados dentro do vacúolo vegetal. Estão relacionados com reguladores de crescimento e aumento do crescimento de células *in vitro*, dormência de sementes, inibição de enzimas, atração de insetos, pássaros e animais (Vickery e Vickery, 1981). De acordo com Paszkowski e Kremer (1988), existe pouca informação disponível sobre a influência de flavonóides na germinação de sementes e crescimento de plântulas.

Segundo Salisbury (1991), as flavonas estão presentes nas folhas onde agem como proteção contra raios UV de onda longa, sendo por esta razão de particular interesse na fisiologia vegetal.

Vários autores concordam que não se pode fazer extrapolação direta dos resultados encontrados em laboratório para o campo. White, Worsham e Blum (1989), relatam que caracterizando adequadamente a alelopatia, o seu verdadeiro impacto pode ser dificultado a menos que fatores da planta, do solo e de microorganismos sejam levados em consideração. A identificação dos compostos responsáveis pelo efeito por poderia favorecer a definição desta provável interação alelopática.

Outro aspecto que deve ser considerado é que a produção e liberação de aleloquímicos pelas plantas, torna-se maior a partir do momento em que estas passam a sentir os efeitos de estresses, seja por água, nutrientes, luz, espaço físico, ou até mesmo a exposição a herbicidas, bem como ataque por microorganismos (Einhellig, 1989).

Li et al., (1992), sugerem ainda, que as condições nutricionais afetam os resultados dos testes em alelopatia. Por exemplo, aumentando a fertilidade do solo pode-se suprimir alguns efeitos de aleloquímicos (Einhellig, 1987). Além do mais, deficiências nutricionais podem ter efeitos aditivos ou mesmo sinérgicos na alelopatia.

Desse modo práticas de manejo tais como melhoramento das condições de drenagem, rotação de culturas, aplicação de nutrientes, manutenção da matéria orgânica do solo, podem contribuir para redução dos efeitos adversos de aleloquímicos (Einhellig, 1987).

Por outro lado, Müller (1969), sugere que os aleloquímicos podem desempenhar um papel significativo no padrão de vegetação e variações em microescala no ambiente químico do solo, tais como aquelas causadas pela decomposição de resíduos vegetais e liberação de metabólitos secundários que são importantes na germinação e estabelecimento de sementes individuais.

A identificação dos tipos de constituintes de folhas de eupatório e seus efeitos biológicos em outros organismos são cruciais para suportar estudos futuros ajudando a demonstrar o seu papel ecológico sob condições naturais e ainda, as vias de liberação, quantidades de substância presentes no ambiente e quantidade absorvida pelos organismos afetados.

Pelo exposto acima fica claro que a alelopatia só poderá ser aplicada de maneira mais segura e objetiva, a medida que estudos mais aprofundados sejam realizados, à nível de campo, casa de vegetação e laboratório de modo interativo e interdisciplinar.

## 6 CONCLUSÕES

1. Os aleloquímicos presentes no extrato de folhas de *Eupatorium maximiliani* Schrad. inibiram completamente a germinação de sementes de caruru e picão preto, parcialmente as sementes de alface e não tiveram efeitos significativos na germinação de sementes de milho, feijão e arroz.
2. Nas placas contendo o extrato CM, ocorreram reduções no crescimento da parte aérea de plântulas de alface, feijão e arroz e para plântulas de milho, não foram observados efeitos significativos.
3. O efeito alelopático de *Eupatorium maximiliani* Schrad se deveu a uma mistura de substâncias polares e apolares, uma vez que várias frações do extrato exibiram atividade na germinação e/ou crescimento de radícula de plântulas de alface.
4. Isolou-se e identificou-se do extrato de folhas *Eupatorium maximiliani* Schrad. a substância 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona a qual individualmente, mostrou efeitos estimulatórios significativos no comprimento de radícula de plântulas de alface, o que foi acompanhado por uma ausência de pêlos radiculares.
5. Para a fração 6 do extrato CM de folhas de *Eupatorium maxiliani* foi verificada atividade inibitória significativa na germinação de sementes e comprimento de radícula de plântulas de alface. Desta fração isolou-se e identificou-se 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, a qual parece ser uma substância inédita, porém outros constituintes estavam também presentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIOTA, G.; CAFIERO, G.; FEO, V.de.; SACCHI, R. Potential allelochemicals from *Ruta graveolens* L. and their action on radish seeds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.11, p.2761-2775, Nov. 1994.
- ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60p. (Circular, 53).
- ALMEIDA, F.S. **Controle de plantas daninhas em plantio direto**. Londrina: IAPAR, 1991. p.10-16. (Circular, 67).
- ASHOK, V.V.; NEWAND, B. M. Polyoxygenated flavonoids from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 11, p. 2625-2627, 1986.
- BANDARA, B.M.R.; HEWAGE, M.C.; KARUNARATNE, V.; WANNIGAMA, G.P.; ADIKARAM, N.K.B. An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, n.6, p.1983-1985, June 1992.
- BARKOSKY, R.R.; EINHELLIG, F.A. Effects of salicylic acid on plant-water relationships. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.2, p.237-247, Feb. 1993.
- BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R.R.; LEUROX, G.D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.11, p.2821-2833, Nov. 1994.
- BOEKER, R.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Further Heliangolides and Guaianaloides from *Eupatorium altissimum*. **Phytochemistry**, Oxford, 25, n.7, p.1669-1672, June 1986.
- BORDOLOI, M.J.; SHUKLA, V.S.; SHARMA, R.P. Absolute stereochemistry of the insect antifeedant. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v.26, n.4, p.509-510, 1985.
- CALERA, M.R.; ANAYA, A.L.; RUIZ, M.G. Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H<sup>+</sup>-ATPase from plasma membrane. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.21, n.3, p.289-297, Mar. 1995.

- CASTRO, P.R.C.; RODRIGUES, J.D., MORAES, M.A.; CARVALHO, V.L.M. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). **Planta Daninha**, Campinas, v. 4, n.2, p.79-85, 1983.
- CAULA, S.A.; VILLAR, S.I.; MARTINO, V.S.; COUSSIO, J.D.; FERRARO, G. E. Polyphenols isolated from *Eupatorium buniifolium*. **Revista Latinoamericana de Química**, Buenos Aires, v.22, n.1, p.1-3, 1991.
- CHEN, P.K.; LEATHER, G.R. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.16, n.6, p.1867-1876, Jun. 1990.
- CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1981.798p. (Secondary Plants Products, v.7)
- D'AGOSTINO, M.; DE SIMONE, F.; DINI, A.; RAMUNDO, E.; ZOLLO, F. Flavonol glycosides from *Eupatorium tinifolium*. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.1, p.353-354, Dec.1990.
- DOLLING, A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C. Seasonal variation in phytotoxicity of bracken (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.12, p.3163-3172, Dec. 1994.
- DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. de **Noções sobre alelopatia**. Jaboticabal: UNESP, 1993. 28p. (Boletim).
- EINHELLIG, F.A. Allelopathy: a natural protection, allelochemicals. In: MANDAVA, N.B. **Handbook of natural pesticides:methods**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v.1, p.161-200.
- EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. **The Science of allelopathy**, New York, p.171-188, 1986.
- EINHELLIG, F.A. Interactions among allelochemicals and other stress factors of the plant environment. In: WALLER, G.R. (ed.) **Allelochemicals role in agriculture and forest.**, Washington: American Chemical Society, 1987. cap.32.
- EINHELLIG, F.A. Interactive effects of allelochemicals and environmental stress. In: WALLER, C.H. (ed.) **Phytochemical Ecology: allelochemicals, mycotoxins, and insect pheromones**. Taipei: Institute of Botany, Academia Sinica, 1989. p. 101-118.
- EINHELLIG, F.A.; LEATHER, G.R. Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.14, n.10, p.1829-1844, Oct. 1988.
- EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A. Effects of three phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and sorghum seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.5, n.5, p.815-824, May. 1979.

- FERRARO, G.; MARTINO, V.; BORRAJO, G.; COUSSIO. 5,7,4,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavanone from *Eupatorium subhastatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.11, p.3092-3093, Oct. 1987.
- FERRARO, G.E.; MARTINO, V.S.; COUSSIO, J.D. 4'4'''-dimethylcupressuflavanone from *Eupatorium subhastatum*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.51, n.3, p.586-587, May-June. 1988.
- FISCHER, N.H.; WEIDENHAMER, J.D.; BRADOW, J. M. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.15, n.6, p.1785-1793, June. 1989.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental** 12 ed. Piracicaba:Nobel, 1987. 467p.
- GOMIDE, M.B. **Potencialidades alelopáticas dos restos culturais de dois cultivares de cana de açúcar (*Saccharum sp*), no controle de algumas plantas daninhas**. Piracicaba: ESALQ, 1993. 99p. (Tese - Mestrado em fitotecnia).
- GONZALEZ, A.G.; BARRERA, J.B.; HERNANDEZ, A.C.Y.; ROSAS, F.E.; DOMINGUEZ, X.A. Eudesmane sesquiterpenes from *Eupatorium quadrangulare*. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, n.8, p.1847-1848. 1985.
- HARBONE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3ed. London: Academic Press, 1988. 356 p.
- HEISEY, R.M. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. **American Journal of Botany**, Columbus, v.83, n.2, p.192-200, Feb. 1996.
- HEJL, A.M.; EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A. Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.3, p.559-568, Mar. 1993.
- HUBERT, T.D.; OKUNADE, A.L.; WIEMER, D.F. Quadrangolide, a Heliangolide from *Eupatorium Qudrangularae*. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.6, p.1751-1753, Mar. 1987.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. Effect of cultivation on allelopathic interference success of the weed, *Pluchea lanceolata*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.5, p.1179-1188, Mar. 1994.
- INOUE, M.; NISHIMURA, H.; LI, H.H.; MIZUTANI, J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm (Polygonaceae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.18, n.10, p. 1833-1840, Oct. 1992.

- JACOBI, U.S.; FERREIRA, A.G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.7, p.935-943, 1991.
- JAKUPOVIC, J.; ELLMAUERER, E.; BOHLMANN, F.; WHITTEMORI, A.; GAGE, D. Diterpenes from *Eupatorium turbinatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.11, p.2677-2678, Oct. 1986.
- KANCHAN, S.D.; JAYACHANDRA. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.55, p.67-75, 1980.
- KIL, B.S.; LEE, S.Y. Allelopathic effects of *Chrysanthemum morifolium* on germination and growth of several herbaceous plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.2, p.299-308, Feb. 1987.
- KINOSHITA, T.; FIRMAN, K. Highly oxygenated flavonoids from *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, n. 4, p. 1207-1210, 1996.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A, 1992. 798p.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983.174p.
- LEHMAN, M.E.; BLUM, U.; GERIG, T.M. Simultaneous effects of ferulic and *p*-coumaric acids on cucumber leaf expansion in split-root experiments. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.7, p.1773-1782, Jul. 1994.
- LI, H.H.; NISHIMURA, H.; HASEGAWA, K.; MIZUTANI, J. Allelopathy of *Sasa cernua*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.18, n.10, p.1785-1796, Oct. 1992.
- LODHI, M.A.K.; BILAL, R.; MALIK, K.A. Allelopathy in agroecosystems: wheat phytotoxicity and its possible roles in crop rotation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.8, p.1881-1891, Aug. 1987.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991. 299p.
- LOVETT, J.V. Allelopathy: the Australian experience. In: PUTNAM, A.R; TANG, C.S (eds). **The science of allelopathy**. New York: John Wiley and Sons, 1986. p. 75-99.
- LUCCHESI, A.A.; OLIVEIRA, R.F. Efeito inibitório na germinação, induzido pelo extrato de couve (*Brassica oleraceae* L. var. acephala DC.). **Anais da Escola Superior Luiz de Queiroz**, v.45, part. I, Piracicaba, p.167-178, 1988.

- MALIK, M.A.B.; PUCHALA, R.; GROSZ, F.A. A growth inhibitory factor from lambsquarters (*Chenopodium album*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.4, p.957-967, Apr. 1994.
- MANTOVANI, W. Composição e similaridade florística, fenológica e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu do Estado de São Paulo. Campinas: UNICAMP, 1983. 147p. (Tese - Mestrado em Biologia).
- McDONALD, G.E.; BRECKE, B.J.; COLVIN, D.L.; SHILLING, D.G. Chemical and Mechanical Control of Dogfennel (*Eupatorium capillifolium*). **Weed Technology**, v. 8, p.483-487, 1994.
- MEDEIROS, R.M.de **Determinação de potencialidades alelopáticas em agroecossistemas**. Piracicaba: ESALQ, 1989. 92p. (Tese - Doutorado).
- MULLER, C.H. Allelopathy as a factor in ecological process. **Vegetatio**, Netherlands, v.18, p.348-357, 1969.
- NAIR, A.G.R.; GUNASEGARAN, R.; KRISHNAN, S.; BAYET, C.; VOIRIN, B. Flavonol glycosides from leaves *Eupatorium glandulosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.40, n. 1, p. 283-285, Sept. 1995.
- NAIR, A.G.R.; JAYAPRAKASAM, R.; GUNASEKARAN, R.; BAYET, C.; VOIRIN, B. 6-hidroxi-kaempferol 7-(6"-caffeoilglucoside) from *Eupatorium glandulosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.33, n.5, p.1275-1276, Jul. 1993.
- NAIR, M.G.; PUTNAM, A.R. Allelochemicals-Herbicides of the future? **Pesticida Science**, Elmsford, v.27, n.2, p.229-231, 1989.
- NEWMAN, E.I. Allelopathy: adaptation or accident? In: HARBONE, J.B. **Biochemical aspects of plant and animal coevolution**. New York: Academic press, 1978. p 327-342.
- NOGUCHI-KATO, H.; MIZUTANI, J.; HASEGAWA, K. Allelopathy of oats. II. Allelochemical effect of L-Tryptophan and its concentration in oat root exudates. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.2, p.315-319, Feb. 1994.
- PANDEY, D.K. Inhibition of Salvinia (*Salvinia molesta* Mitchell) by parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.). II. Relative effect of flower, leaf, stem, and root residue on salvinia and paddy. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.12, p.3123-3131, Dec. 1994.
- PASZKOWSKI, W.L.; KREMER, R.J. Biological activity and tentative identification of flavonoid components in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.) seed coats. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.14, n.7, p.1785-1793, July. 1988.

- PATRICK, Z.A. Phytotoxic substances associated with the decomposition in soil of plant residues. **Soil Science**, Baltimore, v.111, n.1, p. 13-18, 1971.
- PUTNAM, A.R. Weed allelopathy. In: DUKE, S.D. **Weed Physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.131-155.
- PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n.16, p.431-451, 1978.
- RASMUSSEN, J.A.; HEJL, A.M.; EINHELLIG, F.A. THOMAS, J.A. Sorgoleone from root exudates inhibits mitochondrial functions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.18, n.2, p.197-207, Feb. 1992.
- RICE, L.E. Allelopathy an update. **The Botanical Review**, New York, v.15, n.1, p.80-88, 1979.
- RICE, L.E. Allelopathy 2.ed. New York: Academic Press, 1984. 422p.
- RIFFLE, M.S.; WALLER, G.R.; MURRAY, D.S.; SGARAMELLO, R.P. Devil's-claw (*Proboscidea louisianica*), essential oil and its components Potential allelochemical agents on cotton e wheat. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.16, n.6, p.1927-1940, June. 1990.
- RODRIGUES, L.R. de A.; RODRIGUES, T. de J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: UNESP, 1992. 18p.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.
- SCOTT, J.A., KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.3, n.30, 507-512, Sept. 1974.
- SMITH, A.M.; SECOY, D.M. Pest control of the ancients. In: **SYMPOSIUM ON INTEGRATED PEST**. Proceeding. Roma, F.A.O., 1977, p.11-17.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR, G.M.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of Phenolics Compounds in Plant-Soil-Microbial Systems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 10, n. 1, p.63-121. 1991.
- SOUZA, I.F. Alelopatia de plantas daninhas. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.150, p. 75-78, 1988.
- SOUZA, I.F.; GLIESSMAN, S.R. Inibição do crescimento de mostarda (*Sinapsis arvensis* L.) por centeio (*Secale cereale*) em consorciação. **Ciência e Prática**, Lavras, v.17, n.1, p.39-42, jan./mar. 1993.

- STEVENS JR., G.; TANG, C.S. Inhibition of crop seedling growth by hydrophobic root exudates of the weed *Bidens pilosa*. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v.3, part 1, p.91-94, Feb. 1987.
- SWAIN, T. Biochemical evolution in plants. In: FLORKIN, M.; STOTZ, E.H. *Comprehensive biochemistry*. Amsterdam, Elsevier, 1974.p.125-302.— Secondary compounds as protective agents. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 479-501, 1977.
- TUKEY JR., H.B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **The Botanical Review**, New York, v.35, n.1, p.1-16, Jan-Mar. 1969.
- VAUGHAN, D.; ORD, B.G. Influence of phenolics acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. **Journal of the Science of food and Agriculture**. London, v.52, p.289-299, 1991.
- VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: The MacMillian Press, 1981. 493p.
- WEIDENHAMER, J.D. Allelopathic potential of menthofuran monoterpenes from *Calamintha Ashei*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.12, p.3345-3359, Dec. 1994
- WEIDENHAMER, J.D.; MORTON, T.C.; ROMEO, J.T. Solution volume and seed number: often overlooked factors in allelopathic bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n. 6, p.1481-1491, June. 1987.
- WHITE, R.H.; WORSHAM, A.D.; BLUM, U. Allelopathic potential of legume debris and aqueous extrats. **Weed Science**, Champaign, v.37, n.5, p.674-679, Sept. 1989.
- WILLIAMSOM, G.B.; OBEE, E.M.; WEIDENHAMER, J.D. Inhibition of *Schizachyrium scoparium* (Poaceae) by the allelochemical hydrocinnamic acid. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.18, n.11, p.2095-2105, Nov. 1992.
- WOODHEAD, S. Environment and biotic factors affecting the phenolic content of different cultivars of *Sorghum bicolor*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.7, n.6, p.1035-1047, June. 1981
- WU, T.S.; NIWA, M.; FURUKAWA, H.; KUOH, C.S. Eupatriol, a new monoterpene from *Eupatorium t ashiroi* Hayata. **Bulletim of Pharmacy Chemical**, Taiwan, v.33, n.9, p.4005-4006, 1985.

**APÉNDICE**

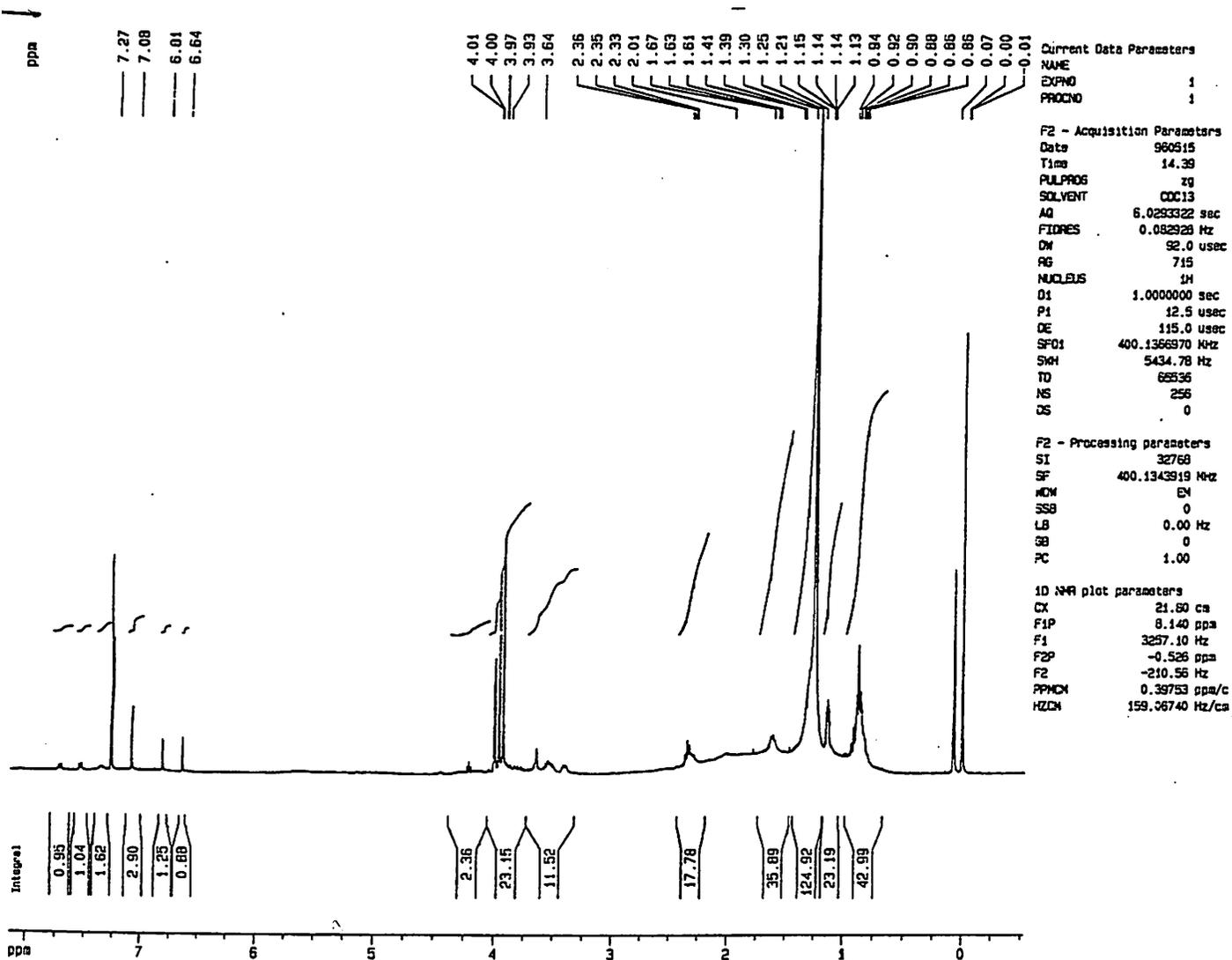


FIGURA 1A. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (d, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da fração 8 do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

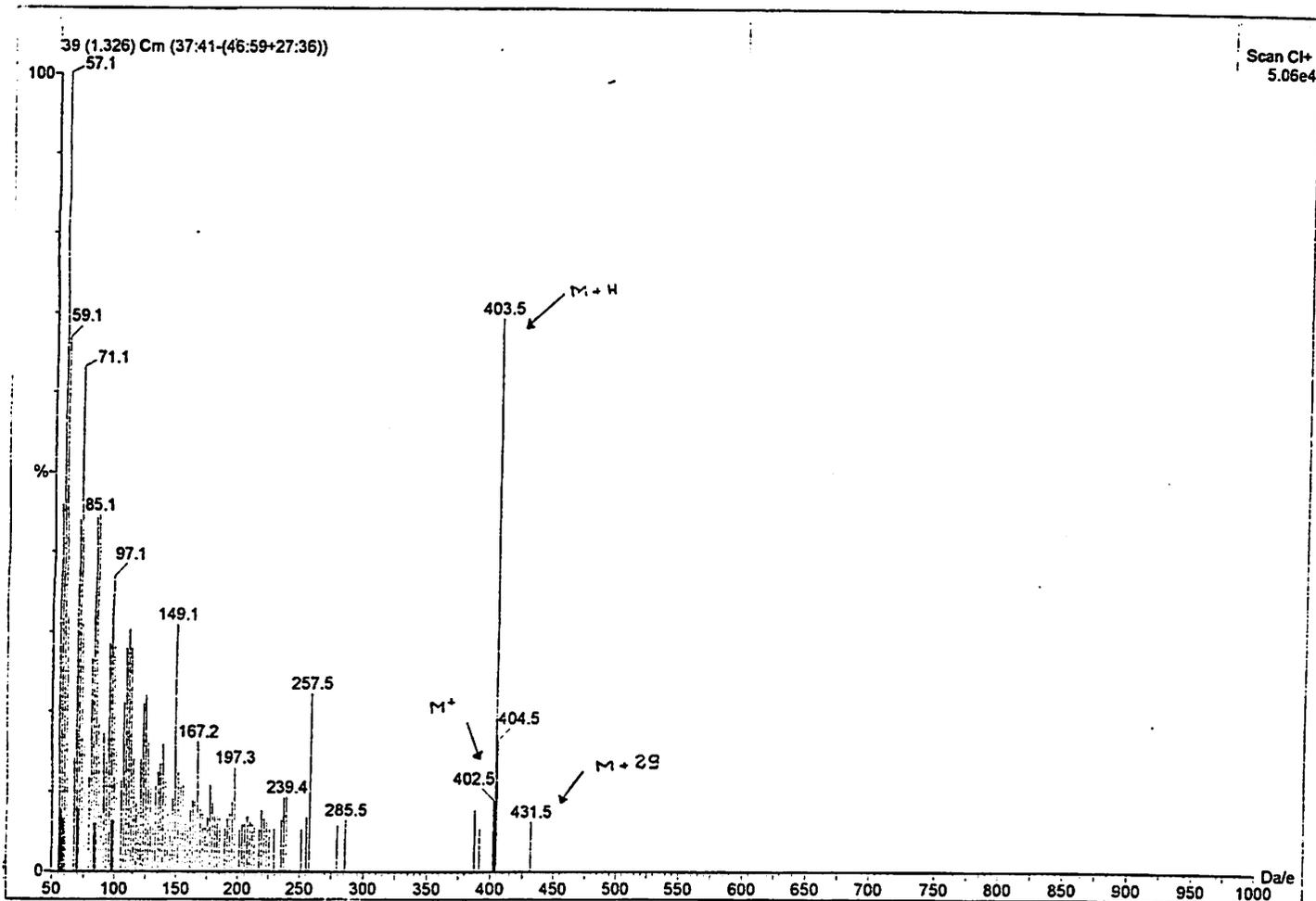


FIGURA 2A. Espectro de massa da fração 8 do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

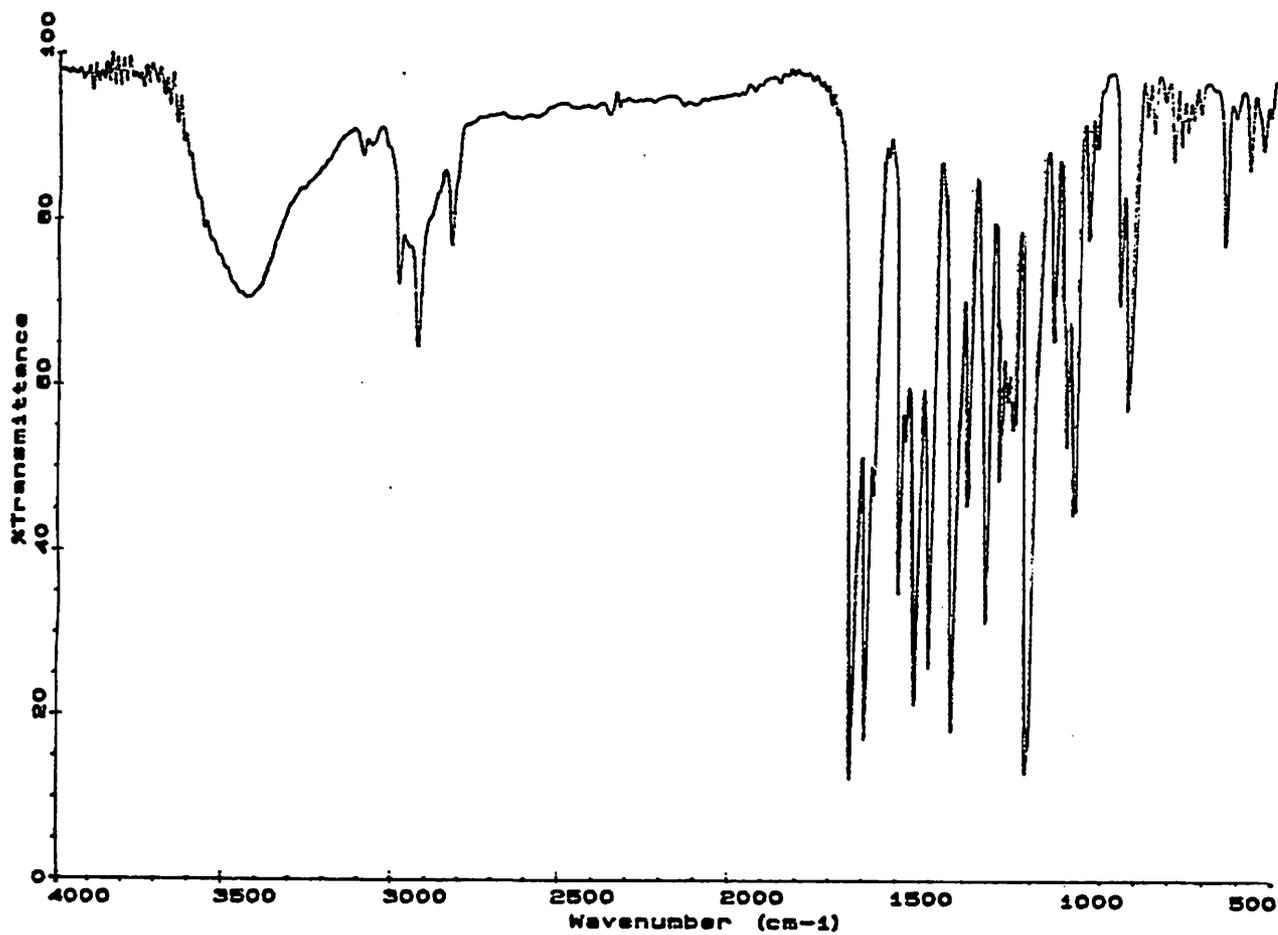


FIGURA 3A. Espectro no IV da substância Em-1 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

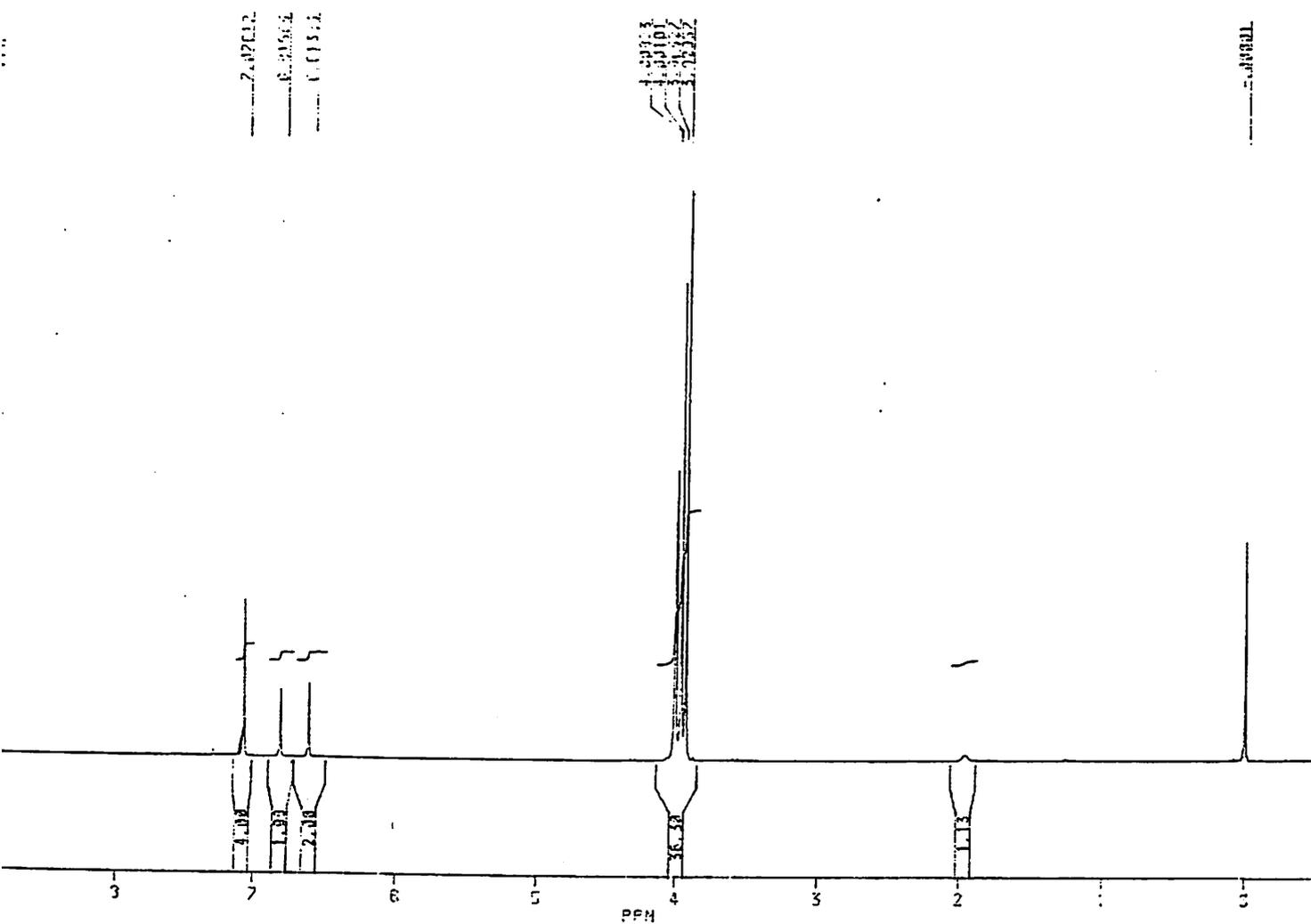


FIGURA 4A. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (d, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância Em-1 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

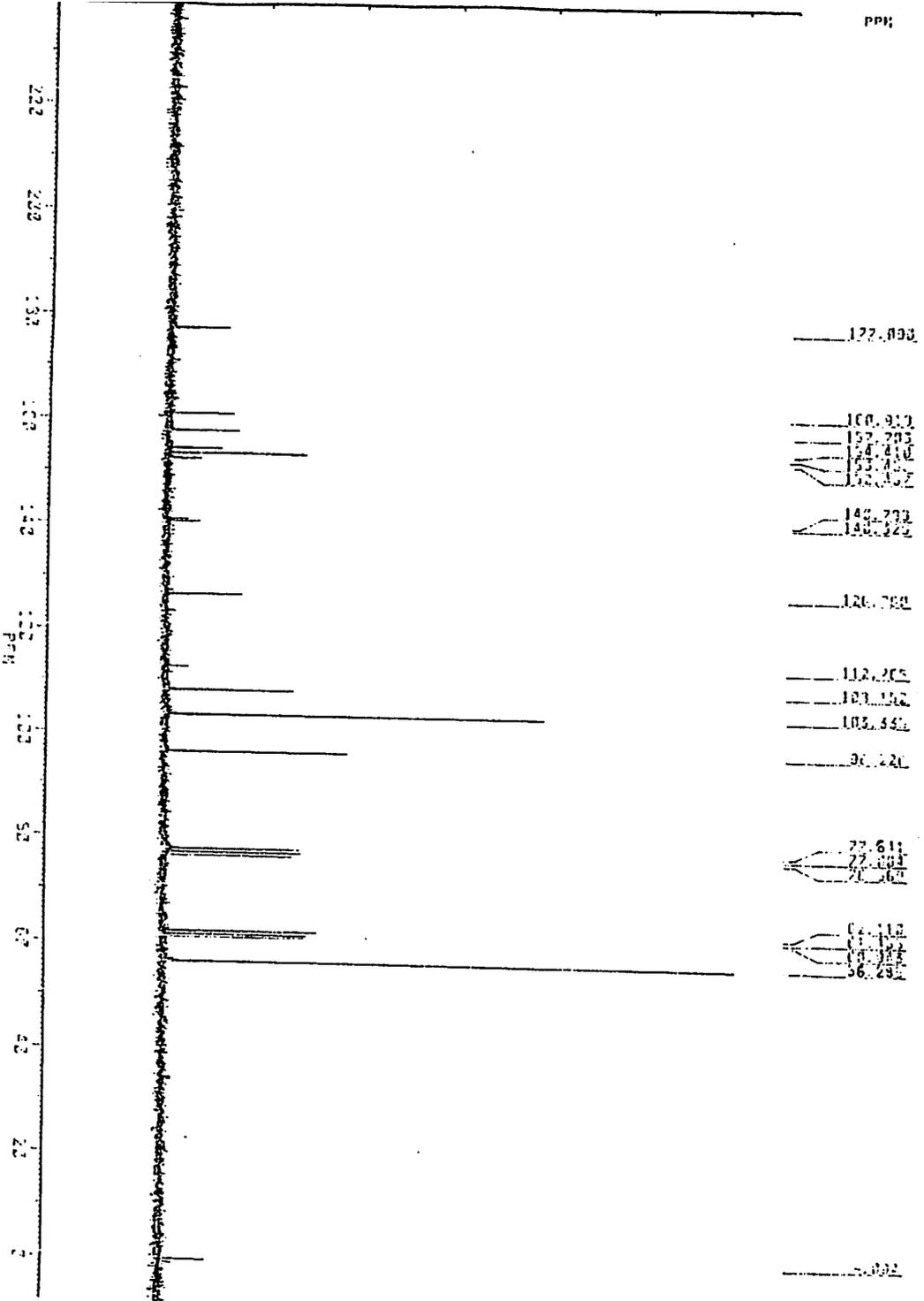


FIGURA 5A. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (d, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância Em-1 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

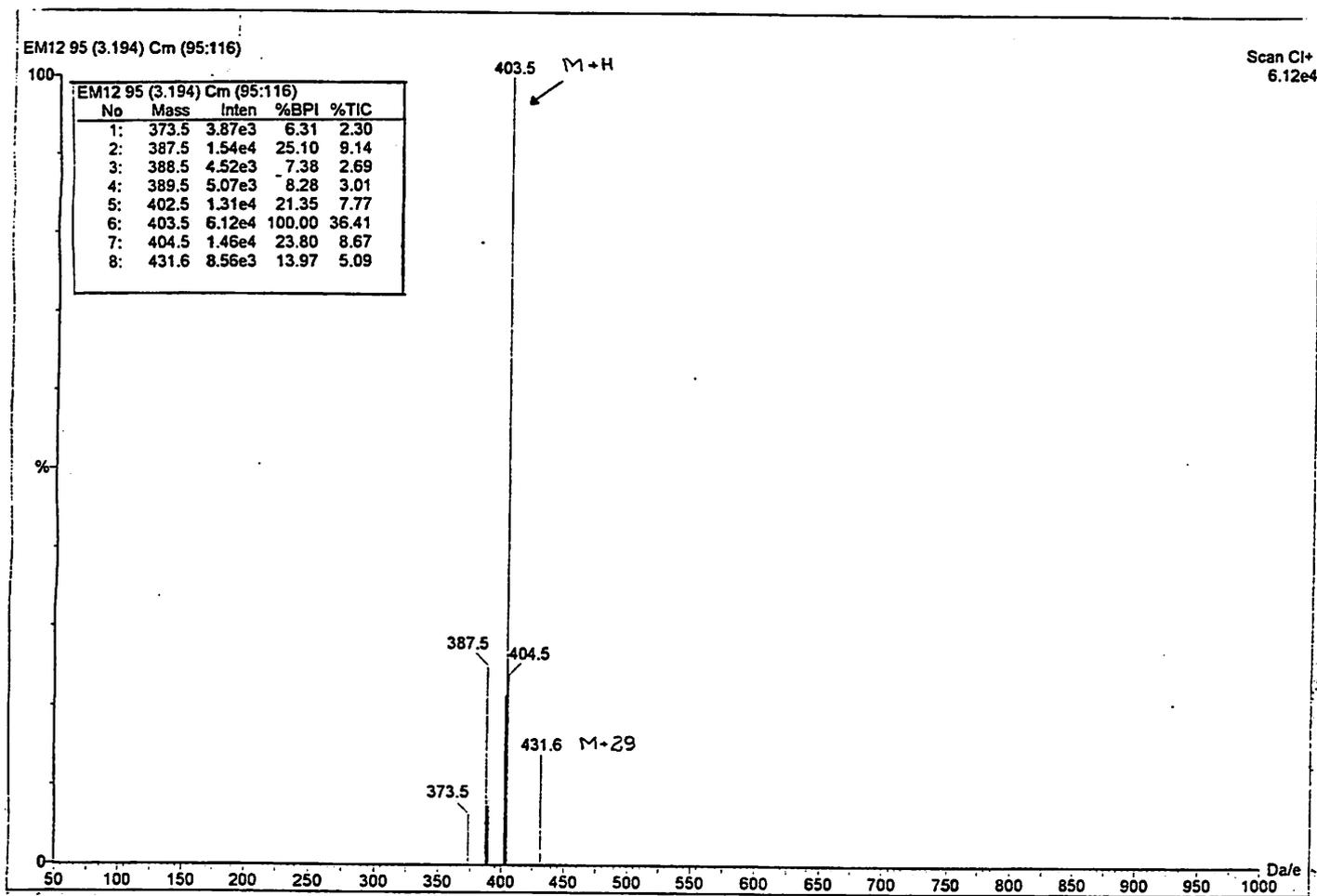


FIGURA 6A. Espectro de massa da substância Em-1 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

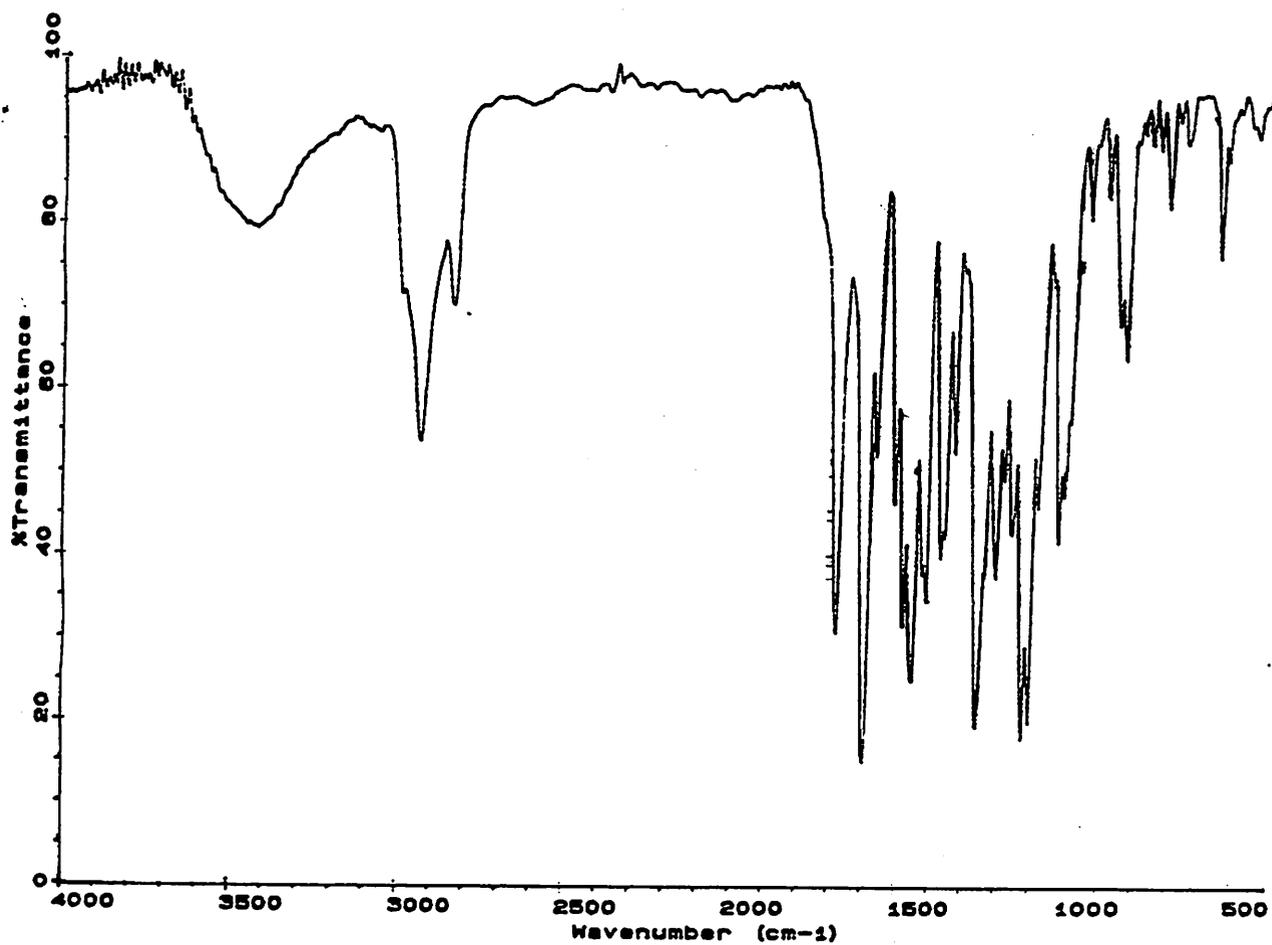


FIGURA 7A. Espectro no IV da substância Em-2 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

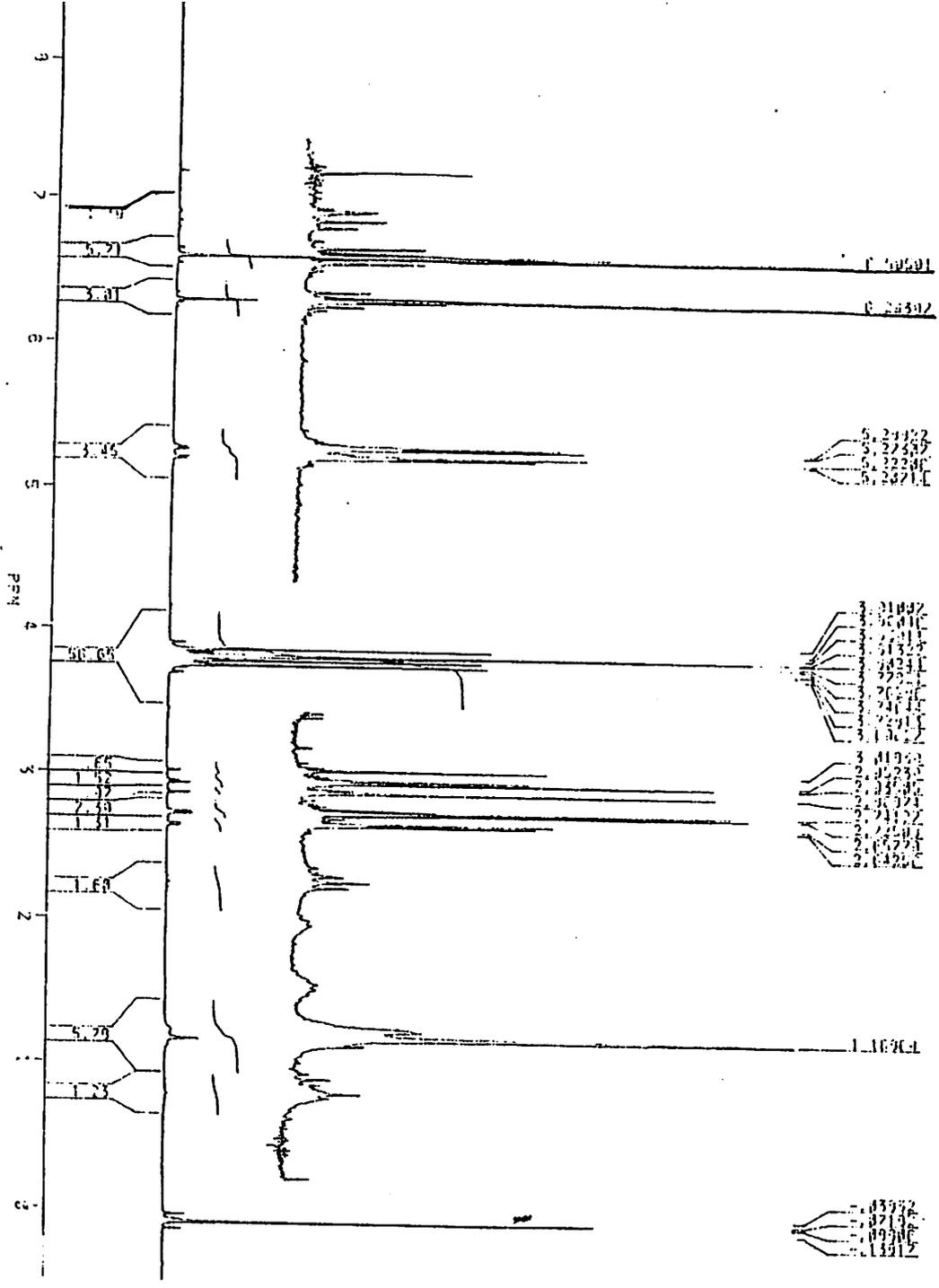


FIGURA 8A. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (d, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância Em-2 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

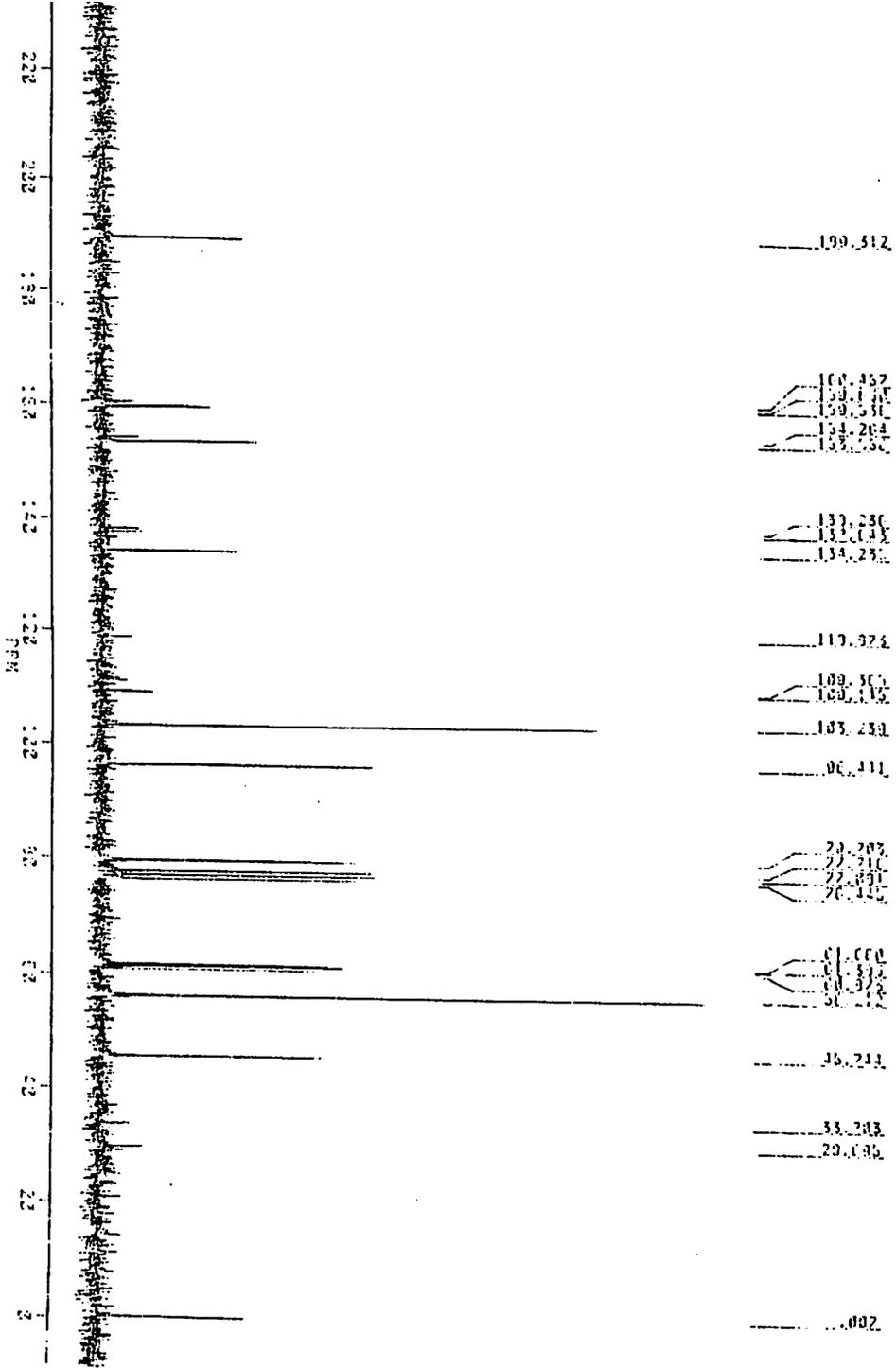


FIGURA 9A. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (d, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância Em-2 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

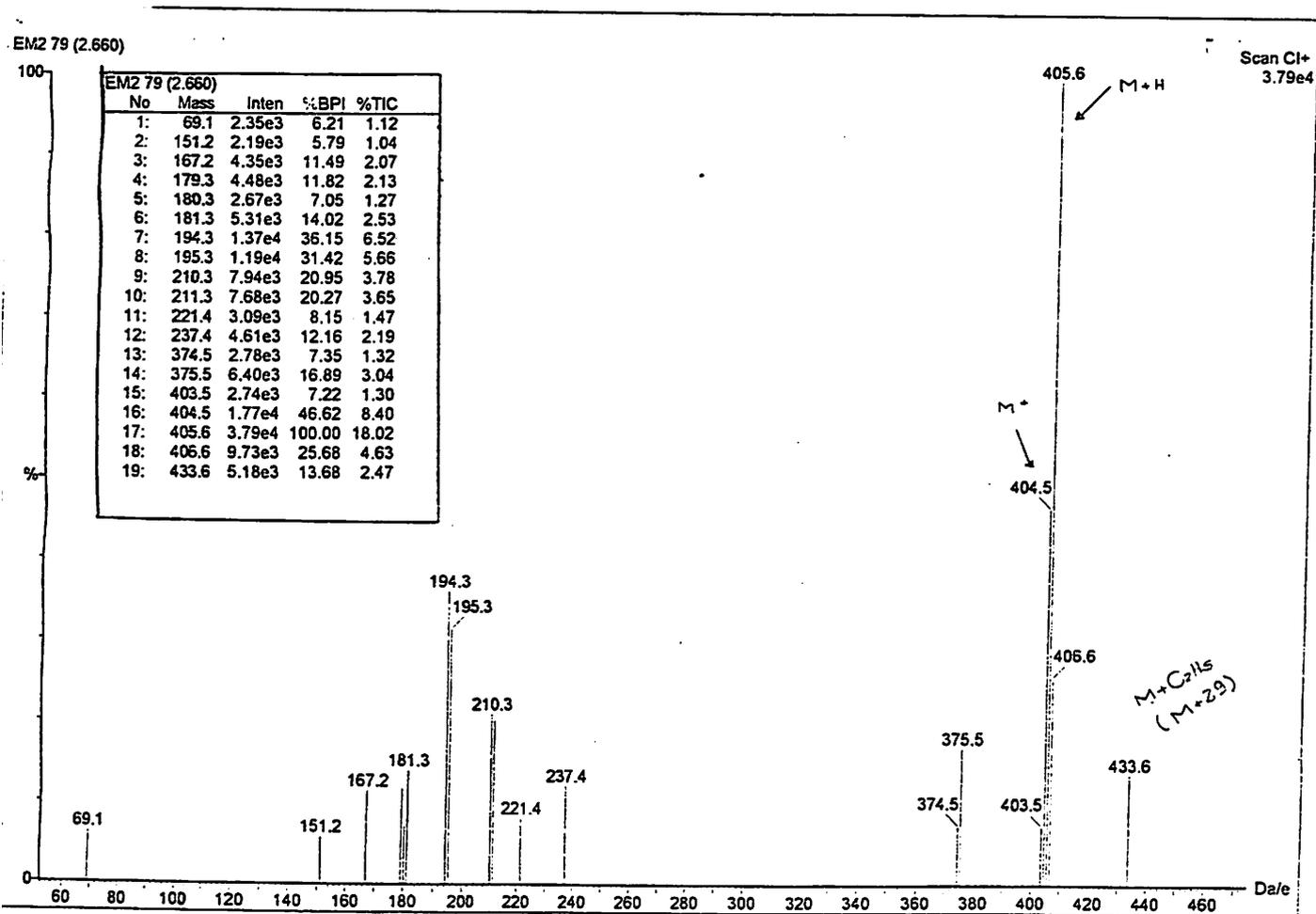


FIGURA 10A. Espectro de massa da substância Em-2 isolada do extrato CM de folhas de *Eupatorium maximiliani*.

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos valores angulares da raiz das porcentagens de germinação de espécies cultivadas e daninhas na presença do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FATORES	GL	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTOS	1	12512,7119 **
ESPÉCIE	5	5651,8969 **
TRAT.* ESP.	5	2649,5001 **
RESÍDUO	58	49,4546
CV (%)	11,1401	
MÉDIA GERAL	63,1268	

\* Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste F

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos dados de comprimento de radícula (cm) de plântulas de milho, arroz, feijão e alface na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FATORES	GL	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTOS	1	57,0457 **
ESPÉCIE	3	27,3427 **
TRAT.* ESP.	3	9,1153 **
RESÍDUO	30	1,6440
CV (%)	43,7516	
MÉDIA GERAL	2,9306	

\* Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste F

TABELA 3A. Resumo da análise de variância dos dados de comprimento de parte aérea (cm) de plântulas de milho, arroz e alface na presença e ausência do extrato CM (10 mg/mL) de folhas de eupatório. UFLA, Lavras - MG, 1996.

FATORES	GL	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTOS	1	6,8861 **
ESPÉCIE	2	3,2307 **
TRAT.* ESP.	2	2,1317 **
RESÍDUO	24	0,0990
CV (%)	20,9774	
MÉDIA GERAL	1,4999	

\* Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste F.