

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Croton doctoris* SOBRE
A GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ASPECTOS
FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM LABORATÓRIO
E CASA DE VEGETAÇÃO**

ANA CARINA DA SILVA CÂNDIDO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2011**

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Croton doctoris* SOBRE A
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS
E BIOQUÍMICOS EM LABORATÓRIO E CASA DE
VEGETAÇÃO**

ANA CARINA DA SILVA CÂNDIDO
Bióloga

ORIENTADOR (A): PROF. DRA SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON
CO-ORIENTADOR (A): PROF. DRA MARIZE T. LOPES PEREIRA PERES

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2011**

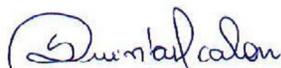
**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Croton doctoris* S. Moore EM LABORATÓRIO E
CASA DE VEGETAÇÃO**

Por

Ana Carina da Silva Cândido

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR
EM AGRONOMIA

Aprovado em: 08/07/2011



Prof. Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon
Orientadora – UFGD/FCA



Prof. Dra. Marize T. Lopes Pereira Peres
Co-orientadora – UFMS



Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
UFSC



Prof. Dr. Rodrigo Kelken Silva Rezende
UFGD/FCA



Prof. Dr. Euclésio Simionatto
UEMS

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu eterno amor e por sempre estar cuidando do meu futuro;

A Professora Silvana P. Q. Scalon e Marize T. L. P. Peres pela orientação, oportunidade, ensinamento e amizade.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação profissional e pelo auxílio nas dificuldades encontradas.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa e financiamento do projeto.

A UFGD e UFMS, pela a oportunidade de desenvolvimento dessa pesquisa;

Ao professor Pedro Jacob Christofolletti pela orientação e amizade durante período de doutorado sanduiche. A Ana Carolina R. Dias pela amizade e ajuda. A ESALQ/USP pela oportunidade de realização do doutorado sanduiche.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Pesticidas Naturais pela amizade, carinho e disposição a toda hora, em especial a Cristiane, Euclésio, Margarida, Hélio e Anyelli pela ajuda e amizade;

Aos meus amigos de Dourados, em especial a Daisa, pela amizade incondicional e apoio em todos os momentos;

A minha família pela minha formação pessoal e pelo apoio e incentivo durante toda minha trajetória.

Ao meu esposo Lucas por todo carinho e amor tão especial, pelo apoio e ajuda em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a crescer e me incentivar sempre.

Enfim sou imensamente grata a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
1. Alelopatia: Histórico e Conceito	10
2. Natureza dos compostos alelopáticos	12
3. Mecanismo de liberação dos aleloquímicos no ambiente	15
4. Mecanismos de ação dos aleloquímicos	16
5. Produtos naturais como herbicidas	18
6. Metodologias usados nos estudos de alelopatia	20
7. Estresse oxidativo	21
7.1. Peroxidase	24
7.2. Catalase	25
7.3. Superóxido dismutase	26
8. <i>Croton doctoris</i>	27
MATERIAL E MÉTODOS	30
1. Coleta do material vegetal	30
2. Extração do óleo essencial	30
3. Obtenção do extrato etanólico bruto do caule e das folhas	30
4. Obtenção das frações semipurificadas	30
5. Composição química e atividade alelopática dos óleos essenciais de <i>Croton doctoris</i>	31
5.1. Análise química do óleo essencial	31
5.2. Atividade alelopática	31
6. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de <i>C. doctoris</i> em laboratório	34
6.1. Bioensaio 1	34
6.2. Bioensaio 2	36
7. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de <i>C. doctoris</i> em casa de vegetação	36
7.1. Bioensaio 1	36
7.2. Bioensaio 2	38
8. Análise estatística	39
RESULTADOS	39
1. Composição química e atividade alelopática dos óleos essenciais	39
2. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de <i>C. doctoris</i> em laboratório	48
3. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de <i>C. doctoris</i> em casa de vegetação	60
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	86

LISTA DE QUADROS**PÁGINAS**

QUADRO 1. Composição química dos óleos essenciais do caule e folhas <i>Croton doctoris</i> (Euphorbiaceae).....	40
QUADRO 2. Frequência das diferentes fases da mitose em células meristemáticas das raízes de plântulas de alface e cebola sob diferentes concentrações do óleo do caule e folhas de <i>Croton doctoris</i>	47
QUADRO 3. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC/EEBF), frações hexânica (FHC/FHF), fração acetato de etila (FAEC/FAEF) e fração etanol-água (FEAC/FEAF) do caule e folhas de <i>Croton doctoris</i> sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface e cebola.....	49
QUADRO 4. Frequência das diferentes fases da mitose em células meristemáticas das raízes de plântulas de alface e cebola sob diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e das folhas (FAEF) de <i>Croton doctoris</i>	60
QUADRO 5. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de <i>C. doctoris</i> sobre a taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada.....	66

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
FIGURA 1. Rotas prováveis de síntese de alguns grupos de aleloquímicos.....	13
FIGURA 2. Vias prováveis de liberação dos aleloquímicos no ambiente.....	16
FIGURA 3. <i>Croton doctoris</i>	28
FIGURA 4. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule (A) e folha (B) de <i>C. doctoris</i> sobre a porcentagem de germinação, crescimento da raiz e hipocótilo e massa seca das plântulas de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....	41
FIGURA 5. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de <i>C. doctoris</i> sobre a porcentagem de germinação, crescimento da raiz e coleótilo e massa seca das plântulas de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....	42
FIGURA 6. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de <i>C. doctoris</i> sobre o teor médio de clorofila total na parte aérea (A) e respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....	43
FIGURA 7. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de <i>C. doctoris</i> sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....	44
FIGURA 8. Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plantas de alface (<i>L. sativa</i>) e cebola (<i>A. cepa</i>) expostas a diferentes concentrações do óleo essencial do caule e folhas de <i>C. doctoris</i>	46
FIGURA 9. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC, EEBF), fração hexânica (FHC, FHF), fração acetato de etila (FAEC, FAEF) e fração etanol-água (FEAC, FEAF) do caule e folhas de <i>C. doctoris</i> sobre o crescimento da raiz, hipocótilo e massa seca das plântulas de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....	50
FIGURA 10. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC, EEBF), fração hexânica (FHC, FHF), fração acetato de etila (FAEC, FAEF) e fração etanol-água (FEAC, FEAF) do caule e folhas de <i>C. doctoris</i> sobre o crescimento da raiz, hipocótilo e massa seca das plântulas de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....	51
FIGURA 11. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) de <i>C. doctoris</i> sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface, crambé, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....	53
FIGURA 12. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila das folhas (FAEF) de <i>C. doctoris</i> sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface, crambé, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....	54
FIGURA 13. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) de <i>C. doctoris</i> sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface, crambé, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....	56

- FIGURA 14. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila das folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface, crambé, corda de viola, cebola, trigo e brachiária. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....57
- FIGURA 15. Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plantas de alface (*L. sativa*) e cebola (*A. cepa*) expostas a diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris*.....59
- FIGURA 16. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....61
- FIGURA 17. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de corda de viola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....62
- FIGURA 18. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....63
- FIGURA 19. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de capim marmelada. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.....64
- FIGURA 20. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial das raízes (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....67
- FIGURA 21. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase da parte aérea (A) e raiz (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....68
- FIGURA 22. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da catalase da parte aérea (A) e raiz (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.....69
- FIGURA 23. Cromatograma do óleo essencial do caule de *Croton doctoris*.....86
- FIGURA 24. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton doctoris*.....87

RESUMO

Os óleos essenciais obtidos do caule e das folhas de *Croton doctoris* S. Moore (Euphorbiaceae) foram analisados por CG e CG-EM resultando em 22 compostos identificados. Efeitos dos óleos essenciais sobre a germinação, crescimento, conteúdo de clorofila, respiração das raízes, atividade da peroxidase, catalase e superóxido dimutase e índice mitótico foram determinados em plântulas de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*). A atividade alelopática do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas do caule e folhas de *Croton doctoris* foi avaliada sobre a germinação e crescimento de alface e cebola em laboratório, e posteriormente avaliou-se o efeito do tratamento com maior fitotoxicidade sobre o metabolismo de alface, crambe (*Crambe abyssinica*), corda de viola (*Ipomea hederifolia*), cebola, trigo (*Triticale aestivum*) e brachiaria (*Brachiaria decumbens*) em laboratório. Nos bioensaios foram utilizadas quatro concentrações (0, 250, 500, 1.000 mg.L⁻¹), com quatro repetições de 50 sementes. A atividade alelopática em casa de vegetação foi avaliada, por meio de aplicação foliar, do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas do caule e folhas de *Croton doctoris* sobre o crescimento e massa seca de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*). E posteriormente avaliou-se o efeito do tratamento com maior fitotoxicidade sobre o metabolismo de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada em casa de vegetação. Para os bioensaios foram utilizadas quatro concentrações do extrato e frações (0, 250, 500, 1.000 mg.L⁻¹), com cinco repetições de quatro plantas. A aplicação foliar dos tratamentos foi realizada após 15 dias da emergência das plantas. Após 15 dias da aplicação realizou-se a avaliação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Os resultados revelaram que o óleo do caule é constituído por 15 compostos, dos quais o óxido de cariofileno (24,5%) e *E*-cariofileno (13,3%) foram os constituintes majoritários. O óleo das folhas apresentou como compostos majoritários o *E*-cariofileno (39,6%) seguido de α -humuleno (13,2%). Os óleos e a fração acetato de etila de *C. doctoris* inibiram a germinação e crescimento das plântulas teste e reduziram o teor de clorofila, respiração da raiz e divisão celular das plantas teste, além de causar estresse oxidativo pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, indicado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas. Em casa de vegetação, a fração acetato de etila das folhas provocou maior inibição no crescimento de alface e capim marmelada e reduziu o acúmulo de massa seca de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada, e, portanto foi considerada a mais ativa, comparativamente aos demais tratamentos. A fração acetato de etila do caule e folhas reduziram a taxa de fotossíntese, o teor de clorofila e respiração da raiz, além de causar estresse oxidativo. *C. doctoris* apresenta substâncias capazes de influenciar a germinação, crescimento inicial, fisiologia e bioquímica das espécies avaliadas.

ABSTRACT

The essential oils obtained from the stems and leaves of *Croton Doctoris* S. Moore (Euphorbiaceae) were analyzed by GC and GC-MS, resulting in 22 compounds identified. Effects of essential oils on germination, growth, chlorophyll content, root respiration, peroxidase, catalase and superoxide dimutase activity and mitotic index were determined on seedlings of lettuce (*Lactuca sativa*) and onion (*Allium cepa*). The allelopathic activity of the crude ethanol extract and semipurified fractions from the stem and leaves of *Croton doctoris* was evaluated on germination and growth of lettuce and onion in laboratory, and evaluate the effect of treatment with higher phytotoxicity on the metabolism of lettuce, crambe (*Crambe abyssinica*), morning glory (*Ipomea hederifolia*), onions, wheat (*Triticale aestivum*) and brachiaria (*Brachiaria decumbens*) in the laboratory. Bioassays were four concentrations (0, 250, 500, 1.000 mg L⁻¹) with four replications of 50 seeds each. The allelopathic activity under greenhouse conditions was evaluated through foliar application of crude ethanol extract and semipurified fractions of the stem and leaves of *Croton doctoris* on growth and dry mass of lettuce, morning glory, onion and alexandergrass (*Brachiaria plantaginea*). And evaluate the effect of treatment with higher phytotoxicity on the metabolism of lettuce, morning glory, onion and alexandergrass in a greenhouse. For bioassays were used four concentrations of extract and fractions (0, 250, 500, 1.000 mg L⁻¹), with five replicates of four plants. The application of treatments were performed after 15 days of plant emergence. After 15 days of application there was the assessment of physiological and biochemical parameters. The results show that the oil from the stem consists of 15 compounds, of which caryophyllene oxide (24.5%) and E-caryophyllene (13.3%) were the main components. The oil from the leaves presented as main compounds E-caryophyllene (39.6%) followed by α -humulene (13.2%). The oil and ethyl acetate fraction inhibited germination and seedling growth of plants test and reduced chlorophyll content, root respiration and cell division of plants test, and cause oxidative stress by increasing reactive oxygen species, indicated by increased activity of antioxidant enzymes evaluated. Under greenhouse conditions, the ethyl acetate fraction of the leaves caused greater growth inhibition of lettuce and alexandergrass and reduced the accumulation of dry mass of lettuce, morning glory, onion and alexandergrass, and thus was considered the most active, compared to other treatments. The ethyl acetate fraction of the stem and leaves reduced the rate of photosynthesis, chlorophyll content and root respiration and cause oxidative stress *C. doctoris* contains substances capable of causing effects on growth, physiology and biochemistry of the species studied.

INTRODUÇÃO GERAL

A chamada agricultura moderna, onde altas produtividades são o foco da atividade, tem estado, sistematicamente, dependente do uso de insumos como os estimulantes de crescimento e de defensivos agrícolas sintéticos. Entretanto, o uso desses produtos tem provocado constantes insatisfações de ordem social em função dos riscos à saúde humana e dos prejuízos ambientais que promovem (MACIAS et al., 2000a).

Dentre os métodos de controle de plantas daninhas, o uso de defensivos agrícolas continua sendo o componente mais importante na hora de aumentar o rendimento das colheitas e reduzir o trabalho nas culturas. No entanto, o uso inadequado e indiscriminado de herbicidas sintéticos além de levar à contaminação dos alimentos utilizados na dieta dos animais e das pessoas tem levado ao crescente aparecimento, em nível mundial, de biótipos de plantas daninhas tolerantes e resistentes a esses herbicidas, o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de produção e problemas graves de contaminação do ambiente (MACIAS et al., 2000a), levando à redução na eficiência dos produtos utilizados, o que redundava em aplicações mais frequentes e em maior volume.

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

Nesse contexto, as milhares de substâncias químicas disponíveis na natureza quer aquelas produzidas por plantas ou pelos microorganismos podem oferecer novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de endemias na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente, preservando os recursos naturais e garantindo a oferta de produtos agrícolas com alta qualidade, desprovidos de resíduos de agentes contaminantes (SOUZA-FILHO e ALVES, 2002).

Durante os últimos 30 anos, grandes esforços têm sido dedicados à descoberta de novos aleloquímicos com potencial aplicação no manejo de plantas daninhas. Os herbicidas desenvolvidos a partir de compostos químicos naturais apresentam importantes vantagens sobre os herbicidas sintéticos usados na agricultura, pois apresentam novos mecanismos de ação, alta biodegradabilidade e baixo impacto no ambiente (MACIAS et al., 2006).

Estudos alelopáticos, biomonitorados, dos óleos essenciais, extratos e frações semipurificadas para isolamento, identificação de novas moléculas químicas e a caracterização das suas propriedades bioherbicidas são, portanto, o início de um caminho para se desenvolver produtos ecologicamente corretos e socialmente justos.

1. Alelopatia: Histórico e Conceito

A idéia de que uma planta pode influenciar no crescimento de outra, é bem conhecida na agricultura, sendo que o primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de plantas vizinhas foi descrito por Theophrastus (300 a.C.), um discípulo de Aristóteles, que observou que plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) não revigoravam o solo como outras plantas, ao contrário, o exauria e, ao mesmo tempo, destruía as plantas invasoras (RICE, 1984).

Plínio (1 d.C) reporta que grão-de-bico, cevada (*Hordeum vulgare* L.), ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) e a noqueira européia, (provavelmente *Juglans regia* L.), foram a causa de muitas preocupações para o homem e injúrias para as plantas da vizinhança (RICE, 1984).

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

De Candolle em 1932, afirmava que o cansaço das terras decorrente da monocultura durante anos seguidos, era ocasionado pelo acúmulo de algumas substâncias exsudadas pelas plantas a qual passava a afetar o próprio desenvolvimento (RICE, 1984).

Somente em 1937 o termo alelopatia foi proposto pelo alemão Hans Molisch, significando do grego *allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo, para referir-se à interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas e inclusive entre microorganismos (RICE, 1984). Muitos anos mais tarde Rice (1984) redefiniu o termo alelopatia como sendo “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microorganismo) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Em 1996, foi criada a Sociedade Internacional de Alelopatia, que definiu-a como sendo a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos (MACIAS et al., 2000b).

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

Muitas das substâncias químicas produzidas pelas plantas que afetam associações de plantas também influenciam outros organismos, oferecendo uma perspectiva mais ampla para o termo alelopatia, que incluem aspectos de defesa de plantas. Normalmente alelopatia é interespecífico, entretanto, se a planta doadora e a receptora pertencerem à mesma espécie ela torna-se intraespecífica, e o termo a ser empregado é autotóxico (MILLER, 1996).

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

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

Dezena de milhares de compostos secundários, de plantas, já foram isolados e estima-se que centenas de milhares existam na natureza. Há evidências de que a maioria dos metabólitos secundários liberados pelas plantas esteja envolvida em interações com outros organismos, como outras plantas, insetos, fungos e herbívoros, ou seja, apresentam potencial para exercer alelopatia em agroecossistemas (DUKE e ABBAS, 1996).

2. Natureza dos compostos alelopáticos

Rice (1984) afirmou a existência de mais 300 compostos secundários vegetais e microbiológicos, entre os agentes alelopáticos, pertencentes a muitas classes de produtos químicos, e esse número continua aumentando com a realização de novas pesquisas. A origem de um aleloquímico freqüentemente é obscura e sua atividade biológica pode ser reduzida ou aumentada pela ação microbiológica, oxidação e outras transformações.

Possíveis fontes de aleloquímicos no ambiente das plantas incluem numerosos microrganismos, certas invasoras, uma cultura anterior ou mesmo a cultura atual. Similarmente, as espécies afetadas podem ser os microrganismos, as invasoras ou a cultura (EINHELLIG, 1986).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos e microorganismos conduzem à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração, principalmente. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente, apresentam atividades biológicas. Muitos são de importância alimentar, agrônômica, de perfumaria, entre outras (SANTOS, 2002).

Durante muito tempo não se sabia exatamente se as substâncias químicas do metabolismo secundário representavam o produto final do metabolismo celular, ou se eram sintetizadas pelas plantas com funções específicas. Alguns autores defendiam a primeira hipótese, baseados no fato de que essas substâncias encontram-se em maior quantidades nos vacúolos das células, onde seriam depositadas a fim de evitarem a própria autotoxicidade. Outros consideravam que a produção dessas substâncias é regida pelas leis da genética e que estão sendo constantemente sintetizadas pelas plantas, defendendo a segunda hipótese (MEDEIROS, 1990).

Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em alelopatia (SANTOS, 2002).

Na Figura 1, verifica-se alguns produtos químicos alelopáticos e as rotas prováveis de síntese dos mesmos.

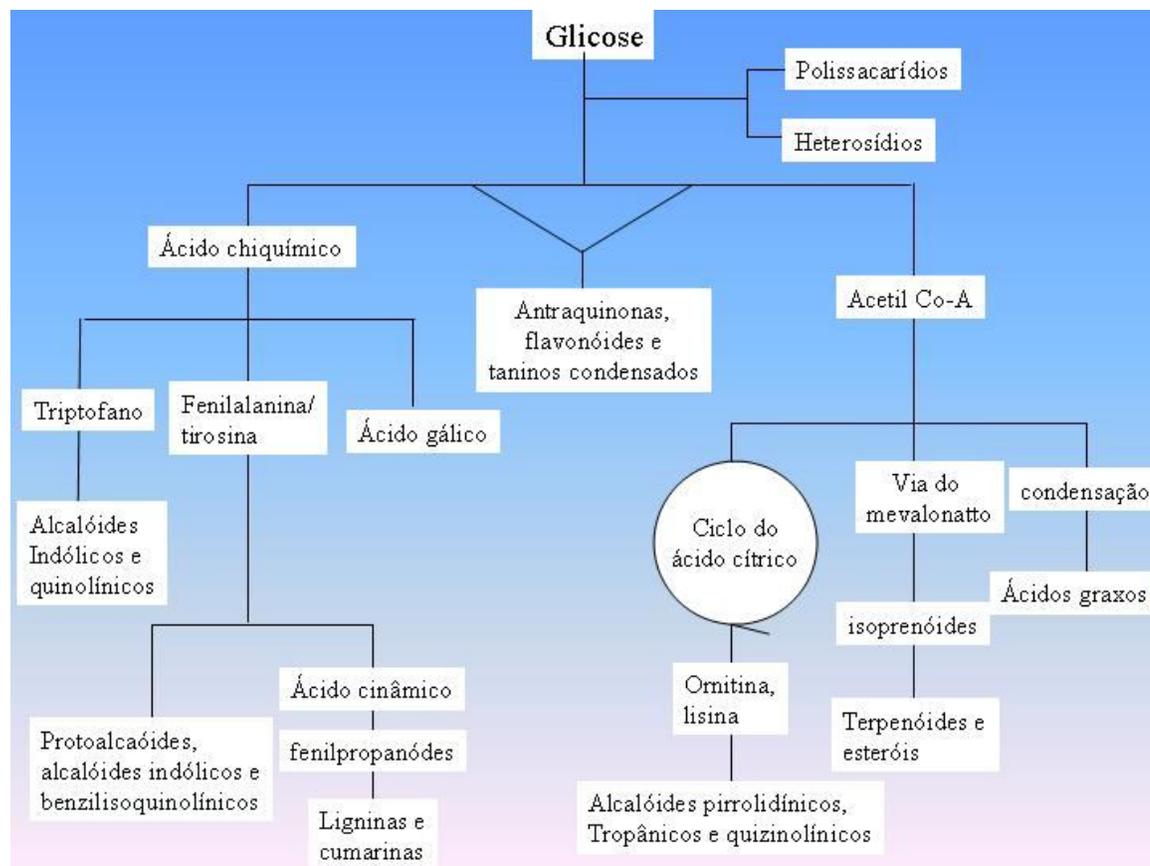


FIGURA 1. Rotas prováveis de síntese de alguns grupos de aleloquímicos.

Não se conhecem todos os produtos químicos com propriedades alelopáticas, bem como a forma como são sintetizados. Os mais comuns pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (MEDEIROS, 1990; DURIGAN e ALMEIDA, 1993).

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

- Ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas; ácidos cítrico, málico, acético e butírico e acetaldeído;
- Lactonas insaturadas simples: patulina e ácido parasórbico;

- Ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos: oléico, esteárico, mirístico e agropireno;
- Naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas: julglona, tetraciclina e aureomicina;
- Fenóis simples, ácido benzóico e derivados: ácido gálico, vanílico e hidroquinona;
- Ácido cinâmico e derivados: ácido clorogênico e ferúlico;
- Cumarinas: escopoletina e umbeliforona;
- Flavonóides: quercetina, florizina e catequina;
- Taninos condensados e hidrolisáveis: ácidos elágico e digálico;
- Terpenóides e esterol: cineol, cânfora e limoneno;
- Aminoácidos e polipeptídeos: marasmina e victorina;
- Alcalóides e cianoidrinas: estriquinina, atropina, codeína, cocaína e amidalina;
- Sulfetos e glicosídeos: sirigrina e alilisotiocianato;
- Purinas e nucleosídeos: cordicepina, teofilina e paraxantina.

Essas substâncias podem estar presentes em todos os tecidos das plantas incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes (PUTNAN e TANG, 1986), e variam em quantidade e qualidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles possuem sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000).

A principal função dos aleloquímicos é a proteção dos organismos que os produzem. A sua ação não é muito específica, podendo uma mesma substância desempenhar várias funções, dependendo mais da concentração, translocação e detoxicação, do que da própria composição química. Por outro lado, um composto que é tóxico para uma dada espécie, pode ser inócuo para outra, mesmo estando com esta estreitamente relacionada (DURIGAN e ALMEIDA, 1993).

Metabólitos secundários às vezes agem como aleloquímicos, no entanto, o termo aleloquímico e metabólito secundário não devem ser usados como sinônimos. Um composto químico pode apresentar vários papéis na natureza, incluindo o de aleloquímico, dependendo do organismo e do parâmetro ambiental específico que afeta o organismo. Assim, um mesmo composto pode às vezes ser um aleloquímico, e outras vezes pode apresentar outros papéis (INDERJIT e DUKE, 2003).

3. Mecanismo de liberação dos aleloquímicos no ambiente

As principais vias de liberação de metabólitos secundários potencialmente envolvidos na alelopatia são: decomposição; exsudação radicular; lixiviação; e volatilização (MEDEIROS, 1990; RODRIGUES et al., 1992; DURINGAN e ALMEIDA, 1993).

Através do processo de decomposição os constituintes químicos dos organismos são liberados para o ambiente e freqüentemente adicionados ao solo. Nesse processo está envolvida a participação dos microrganismos presentes no solo, os quais agem sobre os polímeros presentes nos tecidos, levando a liberação dos compostos tóxicos (SOUZA FILHO e ALVES, 2002).

Os exsudados radiculares são substâncias sintetizadas pelas plantas e liberadas no solo pelas raízes vivas das plantas. Esse termo tem sido usado para descrever todas as substâncias orgânicas exsudadas pelas raízes, por qualquer mecanismo (RICE, 1984).

A lixiviação é a remoção de substâncias químicas de plantas vivas ou mortas, a qual é feita pela ação de chuvas, orvalhos e neblina (SOUZA FILHO e ALVES, 2002).

A volatilização é um processo comum nas plantas aromáticas, embora nem todas as plantas aromáticas estejam envolvidas no mecanismo de alelopatia (SOUZA FILHO e ALVES, 2002).

As substâncias alelopáticas ainda se mantêm nos tecidos das plantas mesmo depois de mortas, de onde são liberadas por volatilização, se forem produtos voláteis, ou por lixiviação, por meio do orvalho e chuva, se forem solúveis na água, sendo arrastadas para o solo, onde, ao atingirem a concentração necessária, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos e das plantas que nele se encontram. Nesse sentido, o efeito alelopático pode se pronunciar tanto durante o ciclo de cultivo, quanto nos cultivos subseqüentes (TEXEIRA et al., 2004).

Verifica-se, na Figura 2, que após a liberação pela “planta doadora”, um composto alelopático pode seguir por diferentes vias (ou ser alterado), até causar o efeito alelopático na “planta receptora” (REZENDE et al., 2000).

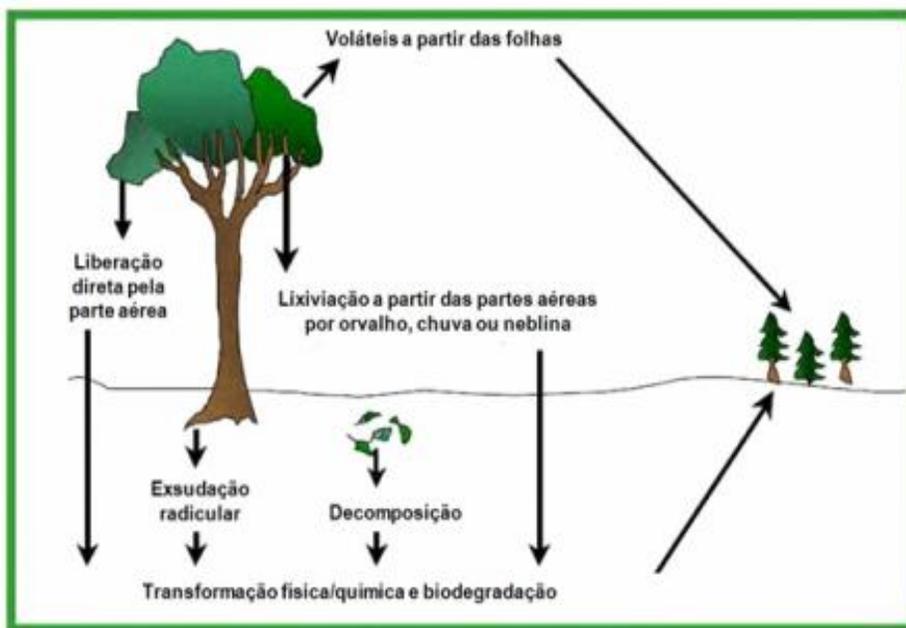


FIGURA 2. Vias prováveis de liberação dos aleloquímicos no ambiente.

Conforme se verifica na Figura 2, as interações que ocorrem são muito complexas, pois os produtos químicos presentes no meio podem vir diretamente de plantas ou surgirem como resultado dos processos de decomposição e formação do húmus no solo. Além disso, a quantidade e a natureza química dos compostos alelopáticos liberados variam com a espécie e idade da planta, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera e tipo de solo (REZENDE et al., 2000).

Vários fatores podem influenciar a natureza alelopática de um composto químico, incluindo o modo de liberação e a ação bioativa. Em parte, porque a concentração, o tempo residente e o destino de um composto químico são bastante controlados pelos fatores do substrato (INDERJIT e DUKE, 2003).

As plantas freqüentemente armazenam e secretam os compostos bioativos em tecidos e células especiais. Estruturas comumente associadas com o acúmulo de compostos secundários em plantas são tricomas glandulares, laticíferos, idioblastos, canais resiníferos e nectários (DUKE et al., 2000a).

4. Mecanismos de ação dos aleloquímicos

Aleloquímicos alteram o crescimento e o desenvolvimento de plantas pela multiplicidade de ações sobre os processos fisiológicos. Há centenas de diferentes

estruturas e muitos dos compostos químicos apresentam vários efeitos fitotóxicos (EINHELLIG, 2002).

O modelo de ação dos aleloquímicos pode, amplamente, ser dividido em ações diretas e indiretas. As ações indiretas podem incluir efeitos que promovem alterações nas propriedades do solo, sua situação nutricional, bem como, alterações na população e ou atividade de microorganismos, insetos, nematóides e outras. O modelo de ação direta envolve os efeitos dos aleloquímicos sobre vários aspectos do metabolismo e desenvolvimento das plantas (SOUZA-FILHO e ALVES, 2002).

Alguns dos efeitos específicos incluem modificação na estrutura e no transporte das membranas, alterações das características da morfologia celular, interferência no ciclo celular (replicação, síntese de proteínas, mitose, mecanismos celulares), modificação da atividade de fitohormônios, perturbação do metabolismo energético (respiração e fotossíntese), problemas no balanço de água e na função dos estômatos, inibição de síntese de pigmentos e bloqueio da função de numerosas enzimas (EINHELLIG, 1986; EINHELLIG, 2002).

A fotossíntese e a atividade respiratória são inibidas por quinonas, ácidos vanílico, ferúlico, cumárico e caféico (RIZVI e RIZVI, 1992; BARKOSKY et al., 2000; GONZÁLEZ-BERNARDO et al., 2003).

Outros compostos, como ancecalina, euparina e dimetilencecalina, extraídos de raízes de *Helianthella quinquenervis*, também inibem a fotossíntese (CASTAÑEDA et al., 1996). Da parte aérea de uma Asteraceae (*Piqueria trinervia*) foram extraídos monoterpenos, demonstrando serem inibidores do fluxo de elétrons da fotossíntese (ANAYA et al., 1996). Os compostos como benzopiranos, lactonas, terpenos e fenilpropanóides, isolados de espécies vegetais, atuam como inibidores da reação de Hill, assim como algumas cumarinas e lactonas sesquiterpênicas que agem como desacopladores e inibidores da transferência de elétrons (KING-DIAZ et al., 2001).

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

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

5. Produtos naturais como herbicidas

A agricultura moderna utiliza herbicidas sintéticos para controlar plantas daninhas aumentando desta maneira a produção das culturas. Os herbicidas sintéticos, porém, causam um impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana (PUTNAN, 1985). O uso indiscriminado de herbicidas também tem provocado um aumento da resistência de plantas daninhas, mudando sua população e causando prejuízos ao meio ambiente (MACIAS et al., 2000a).

Muitos dos compostos químicos sintéticos são prejudiciais ao ambiente devido sua longa persistência no meio, sua toxicidade e atividade carcinogênica e mutagênica. Por causa desses problemas muita atenção tem sido focada em alternativas para o controle de plantas daninhas. Alelopatia, com estudos bioquímicos de interações planta-planta incluindo efeitos positivos e negativos tem sido proposta como possível alternativa para o manejo de plantas daninhas (MACIAS, 1996).

Os vegetais apresentam compostos bioativos, que fazem parte do seu sistema de defesa, que são de fato herbicidas naturais (MACIAS et al., 2000a). Esses produtos naturais bioativos evoluíram por um longo período de tempo e foram selecionados para atividades biológicas específicas. A relação existente entre a estrutura química de um composto produzido por uma planta e a atividade herbicida tem tornado os aleloquímicos candidatos promissores para conduzir ao desenvolvimento de novos herbicidas (DUKE et al., 2001).

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

Há varias razões para o interesse do uso de compostos naturais como herbicidas, pois esses compostos são ambientalmente e toxicologicamente mais seguros que os herbicidas sintéticos, apresentam uma diversidade de estruturas químicas que não são produzidas na química sintética e possuem sítios moleculares que não foram anteriormente explorados pelos herbicidas comerciais (DUKE et al., 2002).

Os produtos secundários de plantas são também considerados menos problemáticos para o meio ambiente, devido a fácil decomposição, porém não deixam de ser componentes químicos, devendo seus efeitos ser estudados. É relativamente pequeno o número de informações sobre pesticidas naturais a organismos não alvo sob condições de campo. Existem resultados de experimentos sobre componentes

individuais em laboratório, mas esses dados não são aplicáveis às condições de campo. São necessários dados toxicológicos para registrar os compostos, mesmo sendo de origem natural (SAITO, 1998).

Diversos compostos biologicamente ativos de uso difundido em nossa sociedade, tiveram sua gênese a partir de um produto natural de origem vegetal, animal ou microbiana (BARBOSA, 2002).

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

Muitos compostos químicos de plantas que inibem o crescimento vegetal têm sido descobertos, como por exemplo, artemisinina, um sesquiterpenóide produzido por *Artemisia annua* L. que é altamente fitotóxico (DUKE e ABBAS, 1996). Um outro exemplo de substância fitotóxica descoberta com estudos de interação planta-planta é a sorgoleona, um potente composto alelopático isolado de espécies de *Sorghum* (DUKE et al., 2000b).

Com modificações químicas alguns metabólitos secundários de plantas com fitotoxicidade podem ser a base de novos herbicidas. Um dos primeiros e mais potentes fitotóxicos estudados em plantas é o 1,8-cineol. Esse composto produzido por muitas espécies de plantas aromáticas tem sido reportado em alelopatia planta-planta (DUKE e ABBAS, 1996).

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

O derivado fenólico grabdinol é um composto floroglucinol-afim que inibe a germinação, transpiração e abertura estomatal (DUKE et al., 2002). Um exemplo mais recente é o composto policarbonilado leptospermona, do qual a classe Tricetona de herbicidas foi desenvolvida (DUKE et al., 2002). O aleloquímico leptospermona foi encontrado em uma espécie australiana nativa, Bottlebrush (*Callistemon citrinus*), que foi introduzida na Grã-Bretanha em 1789. Do leptospermona foi desenvolvido o

herbicida Calisto® (Mesotrione), sendo este talvez o mais bem sucedido herbicida comercial desenvolvido a partir de um aleloquímico. Calisto® foi liberado para o mercado mostrando boa eficácia para o controle de espécies daninhas da cultura de milho e um bom perfil ambiental (CORNES, 2005).

6. Metodologias usados nos estudos de alelopatia

O estudo do comportamento germinativo e do crescimento de uma espécie vegetal sob a ação de aleloquímicos utiliza como ferramentas os bioensaios, que servem para avaliar o potencial alelopático das espécies em estudo e acompanhar a resposta biológica durante as fases de extração, fracionamento, purificação e identificação dos compostos (LEATHER e EINHELLIG, 1986).

Os bioensaios mais utilizados são de germinação de sementes e crescimento de plântulas em placas de Petri com papel filtro (LEATHER e EINHELLIG, 1986; MACIAS et al., 2000a), sendo recomendado para critério morfológico de germinação, ou seja, emissão da radícula, como primeira abordagem, devendo ser seguido por testes de germinação em solo ou areia (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Os testes de germinação, em geral, são menos sensíveis aos aleloquímicos do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, comprimento ou massa seca da raiz ou parte aérea. Porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o processo é discreto, germina ou não germina. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da raiz um dos sintomas mais comuns (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Geralmente, a espécie-alvo mais utilizada é a alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.), devido a sua alta taxa de germinação e sensibilidade. A utilização de espécies comerciais para os bioensaios tem como vantagem o fato dessas espécies serem geneticamente homogêneas, apresentarem germinação uniforme e estarem facilmente disponíveis; já as espécies silvestres são geneticamente mais heterogêneas que as cultivadas, e apresentam vários graus de sensibilidade para tratamento similar, além da germinação não ser uniforme (MACIAS et al., 2000a).

Macias et al., (2000a) propõem o uso de várias espécies como modelos para os bioensaios, representantes de ambas as classes taxonômicas, assim como eudicotiledôneas: *L. sativa* (Alface, Asteraceae), *Daucus carota* L. (Cenoura, Apiaceae), *Lepidium sativum* L. (Agrião, Brassicaceae), *Lycopersicon esculentum* Mill.

(Tomate, Solanaceae); e monocotiledôneas: *Allium cepa* L. (Cebola, Liliaceae), *Hordeum vulgare* L. (Cevada, Poaceae), *Triticum aestivum* L. (Trigo, Poaceae) e *Zea mays* L. (Milho, Poaceae).

7. Estresse oxidativo

O acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu a evolução de organismos aeróbios que utilizam o O_2 comoceptor final de elétrons, permitindo então um maior ganho energético comparado à fermentação e a respiração anaeróbica. No metabolismo aeróbico, o desdobramento de uma molécula de glicose produz um total de 28 moléculas de adenosina tri fosfato (ATP), enquanto que o desdobramento anaeróbico da glicose a etanol e CO_2 produz apenas 8 moléculas de ATP (SCANDALIOS, 1993).

O oxigênio molecular é relativamente não reativo e não tóxico, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas dentro das plantas como resultado da excitação do elétron externo, formando oxigênio simples (1O_2) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH \cdot). Essas moléculas, descritas a seguir, são consideradas “ativas” porque não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas (REZENDE et al., 2003).

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH \cdot).

A superóxido (O_2^-) pode ser produzida na planta por meio de vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidase/sintases ligadas a membrana, peroxidase da parede celular, lipoxigenases e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto. Normalmente, oxida várias moléculas orgânicas, como ascorbato, ou redutor de metais como Fe^{3+} , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (BREUSEGEM et al., 2001).

A maioria do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) celular surge da dismutação do O_2^- catalisada pela superóxido dismutase (SOD). Peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar a passagem através da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de difundir-se rapidamente

através da membrana celular favorece a rápida elicitação da resposta vegetal. O H_2O_2 inativa reversivelmente numerosas enzimas do ciclo de Calvin e outras vias metabólicas pela oxidação de tióis funcionais, podendo também peroxidar lipídeos e pigmentos (APOSTOL et al., 1989).

O radical hidroxila (OH) embora tenha meia-vida curta ($< 1 \mu s$), são radicais potencialmente fortes e com alta afinidade a biomoléculas no seu sítio de produção, o que dificulta o estudo desses radicais (REZENDE et al., 2003). O OH apresenta alto poder de reação com qualquer grupo eletrofílico próximo, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FRIDOVICH, 1995). Segundo a reação de Fenton, a formação de OH requer um íon ferroso e, portanto, o dano causado tem lugar nos sítios de união deste metal às biomoléculas, como é o caso de algumas proteínas, como a rubisco, a glutamina sintetase, etc., ou a dupla hélice do DNA (FRIDOVICH, 1995).

O oxigênio simples (1O_2) semelhante aos radicais hidroxilas, têm aproximadamente 2 μs de vida e são altamente destrutivos, reagindo com a maioria das moléculas biológicas (FOYER, 1994), porém a maioria dos danos são próximos aos sítios onde são produzidos. São predominantemente gerados nos cloroplastos, através da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular. O 1O_2 é muito reativo e, uma vez formado, reage rapidamente com lipídeos da membrana plasmática, com pigmentos e com proteínas que se encontram próximas, especialmente na região do fotossistema II (PSII). Os efeitos mais conspícuos do 1O_2 são o aumento da permeabilidade celular, o extravasamento do citoplasma, a degradação da clorofila *a* e de outros pigmentos fotossintéticos, a destruição das proteínas D1 e D2 do PSII e a formação de radicais orgânicos nos lipídeos de membrana, particularmente aqueles que contêm ácidos graxos com ligações insaturadas (REZENDE et al., 2003).

As EROs são geradas nos diferentes compartimentos celulares como parte de processos fisiológicos normais ou como consequência do funcionamento defeituoso de vias metabólicas (FRIDOVICH, 1995). A fonte mais importante de EROs em plantas são os cloroplastos, que durante o transporte fotossintético de elétrons, tornam os componentes plastídicos alvos de dano oxidativo.

Todas as EROs são extremamente reativas e citotóxicas a todos os organismos (SCANDALIOS, 1993). É geralmente assumido que o \cdot OH e o 1O_2 são tão reativos que suas produções devem ser minimizadas. Muitas enzimas do ciclo de Calvin dentro dos cloroplastos são extremamente sensíveis ao H_2O_2 e altos níveis de H_2O_2 inibem diretamente a fixação de CO_2 . O H_2O_2 demonstrou ser ativo com oxidases de funções

mistas, marcando diversos tipos de enzimas para a degradação proteolítica (SCANDALIOS, 1993). Entretanto, o O_2^- e o H_2O_2 são relativamente pouco reativos em comparação com os outros EROs, mas na presença de íons metálicos (como o Fe) uma série de reações em cascata são iniciadas resultando na produção do $\cdot OH$ na reação de Haber-Weiss e outras espécies destrutivas como lipoperóxidos (BOWLER et al., 1992).

O processo de produção de EROs, assim como de alguns de seus produtos, pode afetar severamente a integridade funcional e a estrutural de membranas biológicas, resultando no aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que leva ao extravasamento de íons K^+ e outros solutos e pode finalmente causar morte celular (CHAOUI et al., 1997). Os danos peroxidativos na plasmalema também levam ao extravasamento do conteúdo celular e dissecação rápida, enquanto que danos em membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória na mitocôndria, causar falência nos pigmentos, e causar perda da habilidade de fixar carbono nos cloroplastos (SCANDALIOS, 1993).

A indução de peroxidação lipídica é um dos efeitos mais danosos das EROs e um indicativo de sua produção, devido sua reação com ácidos graxos insaturados, causando a peroxidação de lipídios de membranas essenciais do plasmalema ou de organelas intracelulares (SCANDALIOS, 1993). A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa dos lipídios insaturados. Ácidos graxos insaturados são aqueles que contêm ligações duplas entre carbonos. Tanto as membranas celulares como as organelas (mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomas) contêm grandes quantidades de ácidos graxos insaturados.

Fatores ambientais adversos como a radiação UV e outras formas de radiação, exposição a níveis elevados de luminosidade, herbicidas, ataque de patógenos, certas injúrias, hiperoxia, ozônio, flutuações de temperatura, seca, concentrações elevadas de sais, poluição do ar, metais pesados e várias outras fontes de estresse são conhecidos como indutores da formação de EROs, na maioria dos organismos aeróbios (SCANDALIOS, 1993).

A suscetibilidade ao O_2 depende do organismo em estudo, de sua idade, estado fisiológico e nutricional. Os principais alvos celulares ou extracelulares para radicais reativos são proteínas, os ácidos graxos insaturados ou os compostos lipoprotéicos, carboidratos e constituintes de DNA. Nas proteínas ocorrem a agregação e ligação

cruzada, fragmentação e quebra, modificação do grupo tiol e consequente modificação no transporte iônico e modificação na atividade enzimática (FRIDOVICH, 1986).

De modo geral, as plantas apresentam vários mecanismos que as protegem dos efeitos tóxicos causados pelas EROs, os quais são produzidos em células tanto estressadas como não estressadas.

Para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, as plantas possuem um complexo sistema antioxidante composto pelas moléculas glutatona e ascorbato e pelas enzimas removedoras de EROs, como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase. As enzimas removedoras de EROs estão presentes em diversos compartimentos celulares, como peroxissomas e glioxissomas, cloroplastos, parede celular, citosol e vacúolo (NOCTOR e FOYER, 1998).

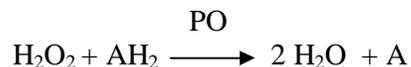
A primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo em plantas é evitar a produção de EROs. Dessa forma, na mitocôndria vegetal a cadeia transportadora de elétrons é adequadamente oxidada mantendo o balanço entre a disponibilidade de substrato e o requerimento de ATP, assim como a ativação de oxidases alternativas, proteínas de despareamento e NAD(P)H desidrogenases insensíveis a rotenona (MOLLER, 2001). Uma vez formadas, as EROs devem ser desintoxicadas tão eficientemente quanto possível, para minimizar a danificação, portanto, os mecanismos de desintoxicação constituem a segunda linha de defesa contra os efeitos deletérios das EROs (MOLLER, 2001). O termo antioxidante descreve qualquer componente capaz de neutralizar as EROs sem sua conversão a radicais destrutivos. As enzimas antioxidantes são consideradas todas aquelas que tanto catalisam tais reações quanto as que são envolvidas no processamento direto das EROs. Portanto, a função dos antioxidantes e das enzimas antioxidantes é interromper as cascatas descontroladas (NOCTOR e FOYER, 1998).

7.1. Peroxidase

Peroxidases (PO) são hemoproteínas de oxidoredutase, específicas para aceptor de hidrogênio, e estão presentes em certas células animais, microrganismos e em tecidos vegetais. Ocorrem em diversos compartimentos celulares, como núcleo, mitocôndrias, ribossomos, paredes celulares e membranas celulares (ALFENAS, 1998).

As reações das POs consistem de dois passos sucessivos, envolvendo um elétron cada. Uma equação geral para reações catalisadas por PO não pode ser formulada, pois o curso da reação depende do tipo de substrato, como fenóis, aminofenóis, diaminas,

indofenóis, ascorbatos e diferentes aminoácidos. No caso em que a mesma molécula orgânica é doadora de elétrons para ambos os passos a equação seria (HIRAGA et al., 2001):



Apesar da função ainda não ser elucidada, as POs desempenham funções como a catálise da oxidação e biossíntese de lignina, gerando H_2O_2 a partir de NADH, oxidação de compostos fenólicos e inibição de crescimento através da oxidação do ácido indol-3-acético (HIRAGA et al., 2001).

Segundo Asada (2006), a catalase está ausente no cloroplasto, dessa forma a remoção do H_2O_2 nesta organela é realizada pelo ciclo ascorbato-glutationa, numa reação envolvendo a ascorbato peroxidase. No cloroplasto existem duas diferentes isoenzimas de ascorbato peroxidase, uma localizada nos tilacóides e outra no estroma (YOSHIMURA et al., 2000; ASADA, 2006). Além das isoenzimas do cloroplasto, o citosol apresenta uma ascorbato peroxidase que é induzida por alta temperatura (PANCHUK et al., 2002).

7.2. Catalase

A catalase (CAT) é uma tetramérica Fe porfirina que catalisa a conversão do H_2O_2 a H_2O e O_2 (FRUGOLI et al., 1996), abundante nos peroxissomos e glioxissomos. As CATs estão presentes em todas as células de plantas, animais e microrganismos aeróbios (SCANDALIOS, 1990). Podem ser encontradas no citoplasma, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos (FRUGOLI et al., 1996). São importantes catalizadoras que atuam como reguladoras dos níveis de H_2O_2 , segundo a reação:



A função da CAT no peroxissomo é metabolizar o H_2O_2 liberado em decorrência da conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração e decompor o H_2O_2 formado durante a β -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos de tecidos de

estocagem de lipídios (HOLTMAN et al., 1994). A CAT tem uma taxa catalítica máxima extremamente alta, mais uma baixa afinidade pelo substrato, uma vez que a reação requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 no sítio ativo. Não há dúvida que a contribuição da CAT na proteção de organismos dos danos pelas EROs é essencial. A CAT também protege a SOD contra a inativação por altos níveis de H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995).

Em plantas superiores, as CATs representam um importante papel no mecanismo de defesa antioxidante e de traduções de sinais, que respondem aos estresses ambientais (LEON et al., 1995).

As CATs parecem ser sensíveis a fotoinativação, especialmente em baixa temperatura, levando a severa inibição da fotossíntese. As reações da catalase tornam-se mais importantes quando a concentração de H_2O_2 aumenta, pois em concentração normal de H_2O_2 , este é reduzido pela glutatona e peroxidase (SCANDALIOS, 1990).

7.3. Superóxido dismutase

As superóxidos dismutase (SOD) são consideradas a primeira linha de defesa contra O_2^- e seus produtos de reação são H_2O_2 e O_2 (ALSCHER et al., 2002). A SOD é a única enzima cuja atividade determina a concentração de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, sendo portanto central no mecanismo de defesa das plantas (LEON et al., 2002).

Por serem enzimas-chave na proteção das células, as SODs catalisam a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 segundo a reação (ALSCHER et al., 2002):



Três classes de SOD foram reportadas em plantas, que foram classificadas de acordo com seu co-fator metálico, manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (AZEVEDO et al., 1998). A Mn-SOD é localizada na mitocôndria, apesar de ter sido reportada nos cloroplastos de algumas plantas (AZEVEDO et al., 1998), enquanto que a Fe-SOD, apesar de observada em um número mais limitado de espécies vegetais, é associada aos cloroplastos (VITORIA et al., 2001). Já as abundantes Cu/Zn-SOD são

geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas e cloroplastos (AZEVEDO et al., 1998). A SOD cloroplástica é geralmente a SOD mais abundante nas folhas verdes, ao mesmo tempo que, em plântulas e material estiolado, as SODs citoplasmáticas e mitocondriais prevalecem. Esta distribuição presumivelmente reflete mudanças ocorridas nos locais subcelulares e formação dos oxiradicaís, ou seja, quando as reações fotossintéticas tornam-se dominantes no metabolismo celular, necessita-se de um aumento na SOD cloroplastidial (BOWLER et al., 1994).

A regulação dos genes de SOD também aparentam ser muito sensíveis a estresses ambientais, presumivelmente como uma consequência do aumento de formação de EROs (BOWLER et al., 1992). É concebível que altos níveis de estresse oxidativo devem resultar em alta degradação da enzima SOD, resultando no requerimento de nova síntese de enzima para manter níveis de SOD suficientemente altos para a proteção efetiva (SCANDALIOS, 1993).

Diferentes estudos têm sido realizados para se compreender a função das SODs no metabolismo das EROs em plantas, sob diferentes condições, como estresse de metais (VITÓRIA et al., 2001) e outros. Também têm sido utilizadas em pesquisas envolvendo manipulação genética, na tentativa de obtenção de fenótipos tolerantes ao estresse (BOWLER et al., 1992). Em todos estes casos foi observada a participação das EROs nos danos celulares e a indução das SODs como importante mecanismo de proteção das plantas.

Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H_2O_2 , ela está também intimamente ligada com a atividade da catalase e peroxidase, mantendo, portanto a interação com estas e outras enzimas e antioxidantes, para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos.

8. *Croton doctoris*

Euphorbiaceae é uma família que tem despertado interesse pelo seu potencial biológico, dada a diversidade de compostos químicos isolados de espécies desta família, como diterpenos, triterpenos, taninos e alcalóides, isolados de diversas partes da planta (PALMEIRA JUNIOR et al., 2005; ARAÚJO JUNIOR et al., 2005).

O gênero *Croton* compreende cerca de 700 espécies, amplamente distribuídas em todas as regiões do Brasil. Várias espécies do gênero são usadas na medicina popular principalmente como antiinflamatória e antibacteriana (PERES et al., 1997).

Croton doctoris S. Moore (Croton: carrapato, semente; doctoris: doutor, medicinal) conhecida popularmente por amarelinho do pantanal, é uma planta nativa da floresta decidual calcária e do Chaco, em Porto Murtinho (MS). Pertence ao grupo das dicotiledôneas e à família Euphorbiácea, é um arbusto de 2 – 3 m de altura, com muitos caules ramificados. Tem como característica principal as folhas velhas tornarem-se amareladas ou alaranjadas, o que originou o nome regional. As folhas de ramos vegetativos são maiores do que as dos floríferos (POTT et al., 2007).

É uma invasora que está aumentando na microrregião de Porto Murtinho (MS), onde se tornou uma das piores invasoras, formando conjuntos densos. Também ocorre em Corumbá (MS) e um pouco no Pantanal em Paconé (MT). Propaga-se por sementes, abundantes, que é transportada por aves. A parte aérea morre com fogo, rebrotando da base. Aparentemente tem efeito alelopático sobre gramíneas, que ficam ralas embaixo desta planta (POTT et al., 2007).

O controle mecânico é ineficaz, mesmo arrancada, pois a planta enraíza de novo com facilidade, basta uma raiz estar em contato com a terra. Rebrotar após repetidos cortes e retorna após aração e gradagem. A flor é visitada por abelhas nativas e a semente comida por aves (POTT et al., 2007).



FIGURA 3. *Croton doctoris*.

Diante do exposto, o objetivou-se avaliar o potencial de atividade alelopática do óleo essencial, extratos e frações do caule e folhas de *Croton doctoris* na germinação,

crescimento e metabolismo de eudicotiledôneas e monocotiledôneas em bioensaios em laboratório e casa de vegetação.

O objetivo geral conduz aos seguintes objetivos específicos:

1. Determinar a composição química e a atividade alelopática dos óleos essenciais do caule e folhas de *C. doctoris* sobre a germinação, crescimento e metabolismo de alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) em laboratório;
2. Avaliar a atividade alelopática do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas do caule e folhas de *Croton doctoris* sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*) e posteriormente avaliar o efeito do tratamento com maior fitotoxicidade, no primeiro bioensaio, sobre o metabolismo de alface, crambe (*Crambe abyssinica*), corda de viola (*Ipomea hederifolia* L.), cebola, trigo (*Triticale aestivum*) e brachiaria (*Brachiaria decumbens*) em laboratório;
3. Avaliar a atividade alelopática por meio de aplicação foliar do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas do caule e folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento e massa seca da parte aérea e raízes de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*(Link) Hitchc.), em casa de vegetação. Posteriormente, avaliar, em um segundo bioensaio, o efeito do tratamento com maior fitotoxicidade, no primeiro bioensaio, sobre o metabolismo de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do material vegetal

O caule e as folhas de *Croton doctoris* S. Moore foram coletados em fevereiro de 2008, em beira de estrada, no município de Porto Murtinho, Estado de Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, nas seguintes coordenadas geográficas 21°48'37,8" S e 57°43'31,5" W. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) em Campo Grande (MS), Brasil, sob nº de registro 20.164.

2. Extração do óleo essencial

O caule e folhas frescas de *C. doctoris* foram submetidos a várias extrações por hidrodestilação durante quatro horas em aparelho do tipo Clevenger modificado, seguido pela extração exaustiva do destilado com hexano. Após a remoção do solvente, o rendimento dos óleos brutos foram calculados em relação ao material fresco.

3. Obtenção do extrato etanólico bruto do caule e das folhas

Para o preparo do extrato etanólico bruto (EEB), o caule e as folhas frescas de *C. doctoris* foram fragmentados em pequenos pedaços e submetidos à extração por meio de maceração com etanol (m/v, 1:2). Após sete dias, realizou-se a filtragem e o material sólido foi descartado, sendo posteriormente o solvente evaporado ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) sob vácuo em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e folhas (EEBF) de *C. doctoris*.

4. Obtenção das frações semipurificadas

Para a obtenção das frações semipurificadas (FS), o EEBC e EEBF foram fracionados através de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, hexano e acetato de etila, obtendo-se as frações: hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA). O teor de água dos extratos e frações foi determinado a partir de uma alíquota dos mesmos, submetidas à secagem (100°C), até que a massa fosse constante.

5. Composição química e atividade alelopática dos óleos essenciais de *Croton doctoris*

5.1. Análise química do óleo essencial

As análises em cromatografia gasosa (CG) foram realizadas em aparelho Varian CP-3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) [30m x 0,25mm, espessura do filme 0,2 (μm)], obtida da Phenomenex (Torrance, CA, USA). As condições de injeção foram: hidrogênio como gás carreador (1 mL/min); injetor split/splitless à 220°C; detector FID (detector de ionização em chama) à 280°C; temperatura do forno foi de 50°C à 250°C com rampa de aquecimento de 4°C/min. As análises em CG-EM foram realizadas em um sistema Varian GC-MS-MS, equipado com um cromatógrafo gasoso Varian – 3900, equipado com coluna capilar ZB-5, um injetor 1077, um injetor automático CP-8410, acoplado a um espectrômetro de massa Varian Saturn 2100, operando com impacto de elétrons de 70 eV, nas mesmas condições da análise do CG/FID. A identificação dos componentes do óleo foi baseada em comparações dos tempos de retenções, pela determinação e comparação dos índices de retenção de Kovats e espectros de massas da biblioteca NBS/NIST com os índices descritos por Adams (1995). Uma série homologa de n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{32}$) foi utilizada para o cálculo dos índices de retenção de Kovats.

5.2. Atividade alelopática

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Pesticidas Naturais da UFMS, em Campo Grande (MS), Brasil. Para o preparo das soluções 0,250 mg do óleo essencial foi emulsionado com Tween 80, na proporção 1:1 (v/v) e dissolvido em água destilada, obtendo-se a solução estoque na concentração de 1%. As demais concentrações (0,5; 0,25; 0,12 e 0,05%) foram preparadas por diluição. Como controle, foi utilizada uma solução de Tween 80 a 1,0% v/v (ALVES et al., 2004).

5.2.1. Bioensaios de germinação

Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº 1, receberam 5,0 mL de água destilada. Em seguida, foram semeados aleatoriamente, sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos das espécies alvo de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids) e cebola (*Allium cepa* L. cv.

Baia Periforme) distribuídas aleatoriamente, com quatro repetições para cada tratamento (BRASIL, 2009). Após a semeadura, 3,0 mL da solução de cada concentração dos óleos essenciais foram distribuídos em dois papéis filtro, colados na tampa da placa, evitando o contato direto com as sementes (ALVES et al., 2004).

As placas de Petri contendo os diásporos foram fechadas e envolvidas com filme plástico e levadas a uma câmara de germinação, com condições de luz (160 W), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, adequadas a espécie alvo (BRASIL, 2009). Após quatro dias de incubação para alface e cinco dias para cebola foi determinada a porcentagem de germinação, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento (FERREIRA e AQUILA, 2000).

5.2.2. Bioensaios de crescimento

Para os bioensaios de crescimento e avaliação dos teores de clorofila, respiração potencial das raízes, atividade enzimática e índice mitótico as sementes foram inicialmente germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular de no mínimo 2,0 mm de comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, sendo então transferidas para as placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação (5.1.1). A leitura dos parâmetros avaliados foi realizada após quatro dias da incubação.

Para a avaliação do crescimento realizou-se a medida do alongamento da raiz e do hipocótilo/coleótilo (dez plântulas por placa) utilizando-se papel milimetrado, sendo posteriormente, essas plântulas levadas a uma estufa a 60°C até peso constante, para a obtenção da massa seca.

Os teores de clorofila foram obtidos após a maceração de 20 mg da parte aérea das plântulas em DMSO (Dimetilsulfóxido), posteriormente o macerado foi deixado em repouso no escuro por 24 horas, a temperatura ambiente. As absorbâncias das soluções contendo clorofila foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) pela atividade da enzima desidrogenase e do

surgimento do formasan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1,0 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas (20 mg) e em seguida transferidas para tubos de ensaios, onde foram adicionados 3,0 mL de TTC 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaios foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30°C por 15 horas. Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e descartadas, em seguida as raízes foram lavadas uma vez com água destilada que posteriormente, também foi drenada ao máximo e descartada. Os tubos de ensaios contendo as raízes foram novamente transferidos para banho-maria com água fervente ($\pm 100^\circ\text{C}$), sendo então adicionados 7,0 mL de etanol 95% (v/v) em cada um deles. Decorridos 10 minutos as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol a 95% (v/v). As absorvâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 530 nm e os resultados expressos nos valores da absorvância (STEPONKUS e LANPHEAR, 1967).

Para a avaliação da atividade enzimática, primeiramente as plântulas frescas (1,0 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio (6,0 mL; 0,2 M; pH 7,0). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (ZENG et al., 2001).

Para a atividade da peroxidase (POD) uma alíquota de 10 μL de extrato foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,0), em seguida os tubos foram levados para banho-maria até a estabilização da temperatura a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 100 μL de guaiacol (0,5%) e 100 μL de H_2O_2 (0,08%) e, imediatamente, efetuou-se as leituras de absorvância em espectrofotômetro na absorvância de 470 nm, com 3 repetições para cada tratamento. A atividade da POD foi calculada usando o coeficiente de extinção de $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o resultado foi expresso em $\mu\text{moles de tetraguaiacol produzido (mg de proteína)}^{-1}$ (ZENG et al., 2001).

Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) 100 μL de extrato enzimático foram adicionados a 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (12,5 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0), a 30°C. Em seguida foi realizada as leituras da absorvância a 240 nm, com 3 repetições para cada tratamento (CAKMAK e MARSCHNER, 1992).

Para avaliar a atividade da superóxido dismutase (SOD), uma alíquota de 100 µL de extrato foi adicionado a 3,0 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), L-metionina (13 mM), nitroazul de tetrazólio (NBT) (0,44 mM), ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (100nM) e por último riboflavina 1 mM. Esta solução foi exposta a luz fluorescente (20 W), a uma temperatura de 25°C por 15 minutos. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A atividade da SOD foi medida no espectrofotômetro à 560 nm em ambos os tipos de extratos (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbância foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que constitui na inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido. O resultado foi expresso em unidade de SOD por mg de matéria fresca⁻¹ (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

Para a determinação do índice mitótico, foram coletados de cada plântula dois centímetros da raiz primária, a partir da extremidade distal, e imersos em fixador de Farmer (3:1, etanol: ácido acético glacial), durante duas horas, a 25°C e, em seguida, foram transferidos para uma solução de álcool 70% e armazenados a 8°C. Para determinação do índice mitótico, as pontas de raízes foram tratadas na seguinte ordem: 1) água destilada por cinco minutos; 2) ácido clorídrico 1,0 M por 30 minutos a temperatura ambiente; 3) água destilada por cinco minutos e 4)orceina acética 2% por 30 minutos. As pontas das raízes coradas tiveram o ápice, 2,0 mm iniciais, cortados sobre lâmina de microscópio, colocando-se em seguida a lamínula e pressionando sob esta o papel de filtro para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio ótico comum, com aumento de 1000X, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos/lâmina. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100 (PIRES et al., 2001).

6. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de *C. doctoris* em laboratório

6.1. Bioensaio 1

Os efeitos potencialmente fitotóxicos dos EEB e FS do caule e folhas de *C. doctoris* foram avaliados sobre a germinação, crescimento da raiz e

hipocótilo/coleóptilo e massa seca das plântulas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids) e cebola (*Allium cepa* L. cv. Baia Periforme). Para os bioensaios, solução-estoque na concentração de 1.000 mg.L^{-1} foi preparada a partir da massa calculada para cada EEB e FS, levando-se em consideração o teor de água, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), sendo as concentrações de 500 e 250 mg.L^{-1} preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS et al., 2000a) com solução de KOH 0,1 N. Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos EEB e FS.

Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos (MACIAS et al., 2000a), preparadas nas concentrações de 250, 500 e 1.000 mg.L^{-1} . Em seguida, semeou-se sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie-alvo (alface e cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução (BRASIL, 2009).

As placas de Petri foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, adequadas a cada espécie-alvo (BRASIL, 2009). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, contabilizando-se como plântulas normais todas que possuíam as estruturas essenciais do embrião desenvolvidas e com no mínimo 2,0 mm de comprimento de radícula (BRASIL, 2009). O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento, primeiramente as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação (MACIAS et al., 2000a). A leitura dos parâmetros avaliados foi realizada após quatro dias da incubação, onde avaliou-se o comprimento da raiz, comprimento do hipocótilo/coleóptilo e massa seca das plântulas segundo metodologia já descrita no item 5.2.2.

6.2. Bioensaio 2

No segundo experimento, os efeitos potencialmente fitotóxico da fração semipurificada do caule e folhas de *C. doctoris* com maior fitotoxicidade, do primeiro bioensaio, foi avaliada sobre o teor de clorofila, respiração das células radiculares, atividade da peroxidase, catalase e superóxido dismutase de alface, crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), corda de viola (*Ipomea hederifolia* L.), cebola, trigo (*Triticale aestivum* L.) e brachiaria (*Brachiaria decumbens* L.) e índice mitótico de alface e cebola. Para os bioensaios, foi realizado o mesmo procedimento já descrito anteriormente para o bioensaio de crescimento. As avaliações dos teores de clorofila, respiração das raízes, atividade da peroxidase, catalase e superóxido dismutase e índice mitótico seguiu metodologia já descrita no item 5.2.2.

7. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de *C. doctoris* em casa de vegetação

7.1. Bioensaio 1

No primeiro experimento avaliou-se o efeito alelopático do extrato etanólico bruto do caule e extrato bruto e frações semipurificadas das folhas de *C. doctoris* sob o crescimento e massa seca da raiz e parte aérea de alface (*Lactuca sativa* L.), corda de viola (*Ipomea hederifolia* L.), cebola (*Allium cepa* L.) e capim marmelada (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc). As frações semipurificadas do caule pelo fato de a massa obtida ser insuficiente, não foi submetida ao bioensaio.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba (SP), em 2009. Localizada entre as coordenadas geográficas de 22°42’30” S e 47°38’00” W, encontrando-se a uma altitude de 456 m. Foi utilizado como substrato, material de um NITOSSOLO VERMELO Eutroférico latossólico (EMBRAPA, 2006), coletado na camada de 0 – 20 cm, sendo realizada quatro amostragens com peso aproximado em 500 g, cada, que foram secadas ao ar ambiente, destorradas e passadas em peneira com malha de 4,0 mm, para a determinação das características químicas. Os resultados obtidos foram: 5,0 de pH em CaCl₂ 0,01 M; matéria orgânica 10 g kg⁻¹, 16 mg dm⁻³ de P e 2,8; 17; 7; 0,0; 20 mm_c dm⁻³, respectivamente, de K, Ca, Mg, Al, H + Al, Sb 27; CTC 47; e 57% de saturação em bases.

Com base nos resultados da análise química do solo foi realizada a calagem para a correção da acidez do solo, utilizando-se o calcário dolomítico finamente moído (PRNT=100%), cuja composição apresenta 34,5% de óxido de cálcio (CaO) e 18% de óxido de magnésio (MgO), calculou-se a quantidade necessária para elevar a saturação por bases a 65%. Os vasos (1,5 L) preenchidos com uma mistura de NITOSSOLO VERMELO Eutroférico latossólico e vermiculita (3:1 v/v) foram mantidos úmidos por meio da adição de água e incubados por 20 dias. Após esse período efetuou-se a semeadura de oito sementes, em cada vaso, de alface (*L. sativa* cv. Grand Rapids), corda de viola (*I. hederifolia*), cebola (*A. cepa* L. cv. Baia Periforme) e capim marmelada (*B. plantaginea*), adquiridas comercialmente, com profundidade de $\pm 1,0$ cm (PRATES, 2000). Após cinco dias da emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando-se quatro plantas por vasos, uniformes e equidistantes.

Decorridos cerca de 15 dias após a emergência das plântulas, foi realizada a aplicação das soluções tratamentos. Para o preparo das soluções o EEBC, EEBF e as frações semipurificadas (FS) das folhas (fração hexânica - FHF, fração acetato de etila - FAEF e fração etanol-água - FEAF) foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000) e emulsionados em Tween 80 (1%) obtendo-se a solução-estoque na concentração de 1.000 mg.L^{-1} (levando-se em consideração o teor de água). As concentrações de 500 e 250 mg.L^{-1} foram preparadas por diluição. Como controle aplicou-se uma solução contendo DMSO a 0,1% e emulsionados em Tween 80 (1%). A aplicação das soluções tratamento foi realizada utilizando um pulverizador pressurizado (CO₂), provido de uma barra com duas pontas 110.02 e regulado para uma vazão de 150 L/ha.

Decorridos 15 dias da aplicação dos tratamentos, foi realizada a avaliação do comprimento (cm) da parte aérea e da raiz, sendo as plantas levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca da parte aérea e raízes, em gramas (NINKOVIC, 2003).

Para cada espécie (alface, corda de viola, cebola e capim marmelada) e cada tipo de extrato e frações (EEBC, EEBF, FHF, FAEF, FEAF), o delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1.000 mg.L^{-1}), em cinco repetições. A unidade experimental constituiu-se de quatro plântulas para avaliação do crescimento e massa seca da raiz e parte aérea.

7.2. Bioensaio 2

No segundo experimento, os efeitos potencialmente fitotóxico da fração semipurificada do caule e folhas de *C. doctoris* com maior fitotoxicidade, do primeiro bioensaio, foi avaliada sobre a taxa de fotossíntese, taxa de transpiração, condutância estomática, teor de clorofila, respiração potencial das raízes e atividade da peroxidase e catalase. O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente a Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados (MS), em 2009. Localizada entre as coordenadas geográficas de 22°13'13" S e 54°17'01" W, encontrando-se a uma altitude de 430 m. Foi utilizado como substrato, material de um LATOSSOLO VERMELHO distroférrico (EMBRAPA, 2006), coletado na camada de 0 – 20 cm, sendo realizada quatro amostragens com peso aproximado em 500 g, cada, que foram secadas ao ar ambiente, destorradas e passadas em peneira com malha de 4 mm, para a determinação das características químicas. Os resultados obtidos foram: 4,7 de pH em CaCl₂ 0,01 M; matéria orgânica 6 g dm⁻³, 1 mg dm⁻³ de P e 0,4; 7; 2; 8,0; 26 mm_c dm⁻³, respectivamente, de K, Ca, Mg, Al, H + Al, Sb 9,4; CTC 35; e 26% de saturação em bases. Com base nos resultados da análise química do solo foi realizada a calagem para elevar a saturação por bases a 65% e adubação seguindo as recomendações de Raij (1991).

A metodologia adotada no segundo experimento foi semelhante a descrita no primeiro experimento. Os vasos (1,5 L) foram mantidos úmidos por meio da adição de água e incubados por 20 dias. Após esse período efetuou-se a semeadura de oito sementes de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Após cinco dias da emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando-se quatro plantas por vasos, uniformes e equidistantes.

Decorridos cerca de 15 dias após a emergência das plântulas, foi realizada a aplicação das soluções tratamentos. Para o preparo das soluções da FAEC e FAEF utilizou-se metodologia descrita acima. A aplicação das soluções tratamento foi feita utilizando um pulverizador pressurizado (CO₂), provido de uma barra com duas pontas 110.02 e regulado para uma vazão de 150 L/ha.

Decorridos 15 dias da aplicação dos tratamentos, foi realizada a avaliação da taxa de fotossíntese, taxa de transpiração, condutância estomática, teor de clorofila, respiração das raízes e atividade da peroxidase e catalase.

As avaliações de taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática foram realizadas sob condições naturais entre as 9:00 e 10:00 horas da manhã, em folhas totalmente expandidas com auxílio do medidor portátil de fotossíntese LCi.

Os teores de clorofila, respiração das raízes, atividade da peroxidase e catalase foram avaliados segundo metodologia descrita no item 5.2.2.

Para cada espécie e FS o delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizado envolvendo dois ensaios simples (FAEF/FAEC) com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1.000 mg.L⁻¹), em cinco repetições.

8. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

1. Composição química e atividade alelopática dos óleos essenciais

O rendimento dos óleos de *C. doctoris*, calculado sobre a massa do material fresco, foi de 0,29% para o caule e 0,31% para as folhas. Os componentes químicos nos óleos essenciais do caule e folhas identificados por CG-FID e CG-MS, incluindo seus respectivos índices de retenção e porcentagens, estão sumarizados no quadro 1, sendo aqui, sua composição química descrita pela primeira vez.

Foram identificados e quantificados 22 compostos, sendo que no óleo do caule foi possível identificar 15 compostos representando 96,8% da composição química total do óleo, e no óleo das folhas foram identificados 20 compostos representando 87,8% da composição química total. Os compostos majoritários presentes no óleo essencial do caule foram o óxido de cariofileno (24,5%), seguido do *E*-cariofileno (13,3%). O óleo das folhas apresentou como composto majoritário o *E*-cariofileno (39,6%), seguido do α -humuleno (13,2%), óxido de cariofileno (7,5%), que corresponde a 60,1% do total.

QUADRO 1. Composição química dos óleos essenciais do caule e folhas *Croton doctoris* (Euphorbiaceae)

Compostos ^a	Caule (%)	Folhas (%)	RI ^{b,c}
01 α -copaeno	-	0,20	1375
02 β -bourboneno	-	0,45	1380
03 β -elemeno	-	1,2	1386
04 <i>E</i> -cariofileno	13,3	39,6	1420
05 β -copaeno	-	0,35	1429
06 α -guaiano	-	0,7	1434
07 aromadendreno	-	1,2	1440
08 ni	-	0,4	1449
09 α -humuleno	5,4	13,2	1456
10 β -selineno	3,1	3,1	1489
11 α -selineno	2,7	3,6	1496
12 <i>E</i> -nerolidol	5,1	-	1561
13 espatulenol	5,3	3,4	1579
14 óxido de cariofileno	24,5	7,5	1584
15 humuleno epóxido II	5,6	1,8	1612
16 ni	4,2	1,8	1618
17 alloaromadendreno epóxi	4,2	1,5	1635
18 cariofila-4(14), 8(15)-dien-5-ol	5,5	1,5	1640
19 <i>neo</i> -intermedeol	7,6	1,4	1660
20 ni	2,8	-	1667
21 <i>E</i> -cariofileno <14-hidroxi-9-epi>	3,3	-	1673
22 ni	4,2	4,9	1839
<i>Sesquiterpenos não oxi.</i>	23,9	64,0	
<i>Sesquiterpenos oxi.</i>	61,1	17,1	
Total	96,8	87,8	

^aCompostos listados de acordo com a ordem de eluição na coluna ZB-5; ^bIdentificação: IR, índice de retenção, CG-EM, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; ^c Índices de retenção por temperatura programada determinados na coluna apolar ZB-5 (50-250 °C; 3 °C min⁻¹).

Nos resultados de fitotoxicidade, verificou-se que os óleos essenciais do caule e folhas de *C. doctoris* inibiram a germinação, o crescimento da raiz e hipocótilo/coleóptilo de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*) (Figuras 4 e 5). Os efeitos inibitórios mais acentuados foram evidenciados para a concentração de 1% do óleo do caule (Figura 4A e 5A) que reduziu a porcentagem de germinação em 57% e 72% e inibiu o crescimento da raiz em 46% e 58% e do hipocótilo/coleóptilo em 52% e 54% de alface e cebola, respectivamente, em relação ao controle. Sendo que em cebola, verificou-se redução no acúmulo de massa seca de 29%, em comparação ao controle, para a concentração de 1%.

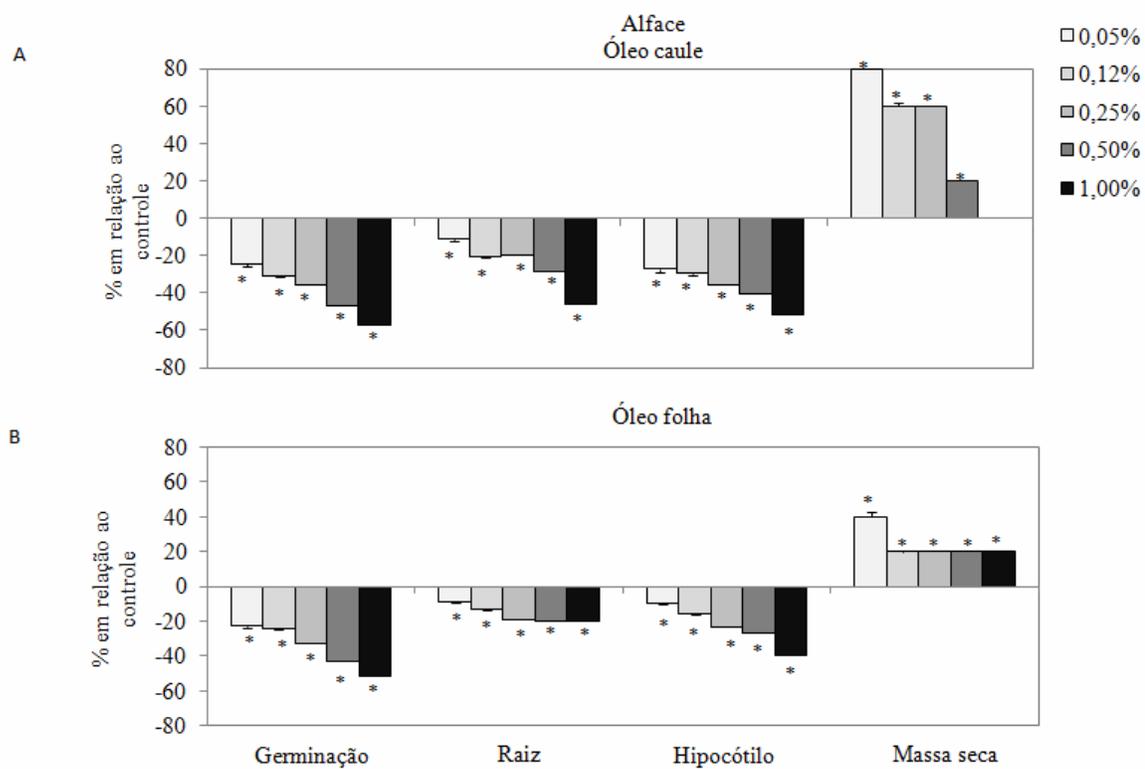


FIGURA 4. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule (A) e folha (B) de *C. doctoris* sobre a porcentagem de germinação, crescimento da raiz e hipocótilo e massa seca das plântulas de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnett.

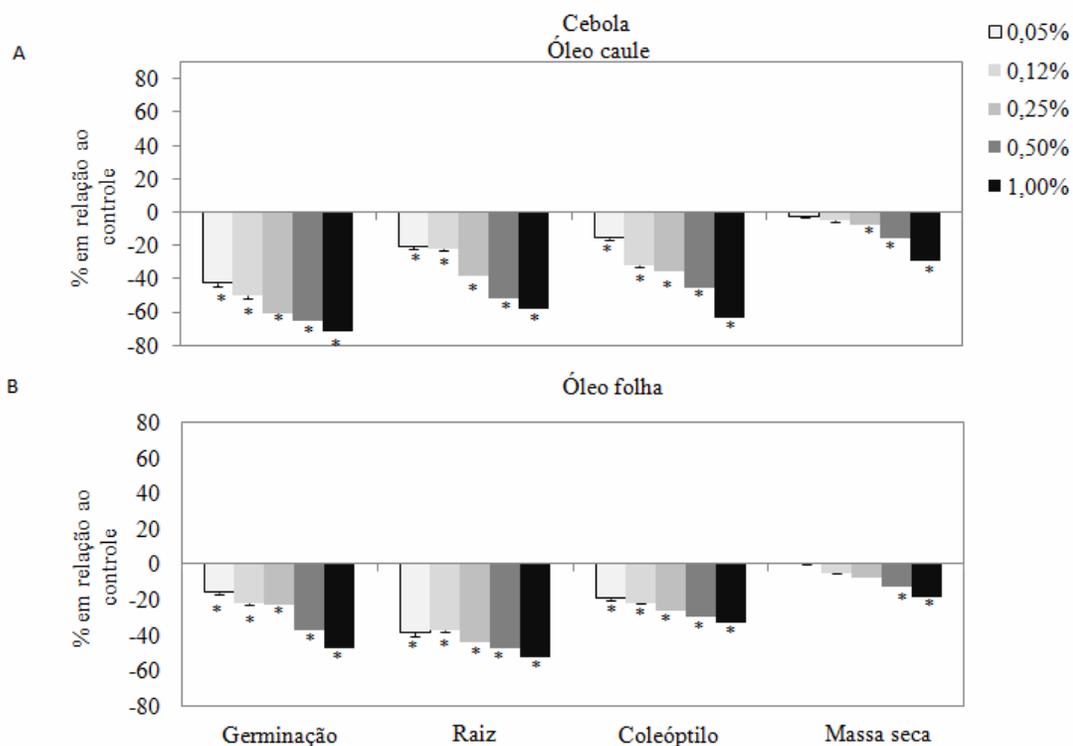


FIGURA 5. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de *C. doctoris* sobre a porcentagem de germinação, crescimento da raiz e coleóptilo e massa seca das plântulas de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

A produção de clorofila das plântulas de alface e cebola (Figura 6A) foi inibida pelos óleos essenciais do caule e folhas de *C. doctoris*. As maiores reduções nos teores de clorofila total foram observadas quando as plântulas foram submetidas a concentração de 1% do óleo do caule, que reduziu a clorofila total de alface em 56% e de cebola em 66%, tendo como base de comparação o controle.

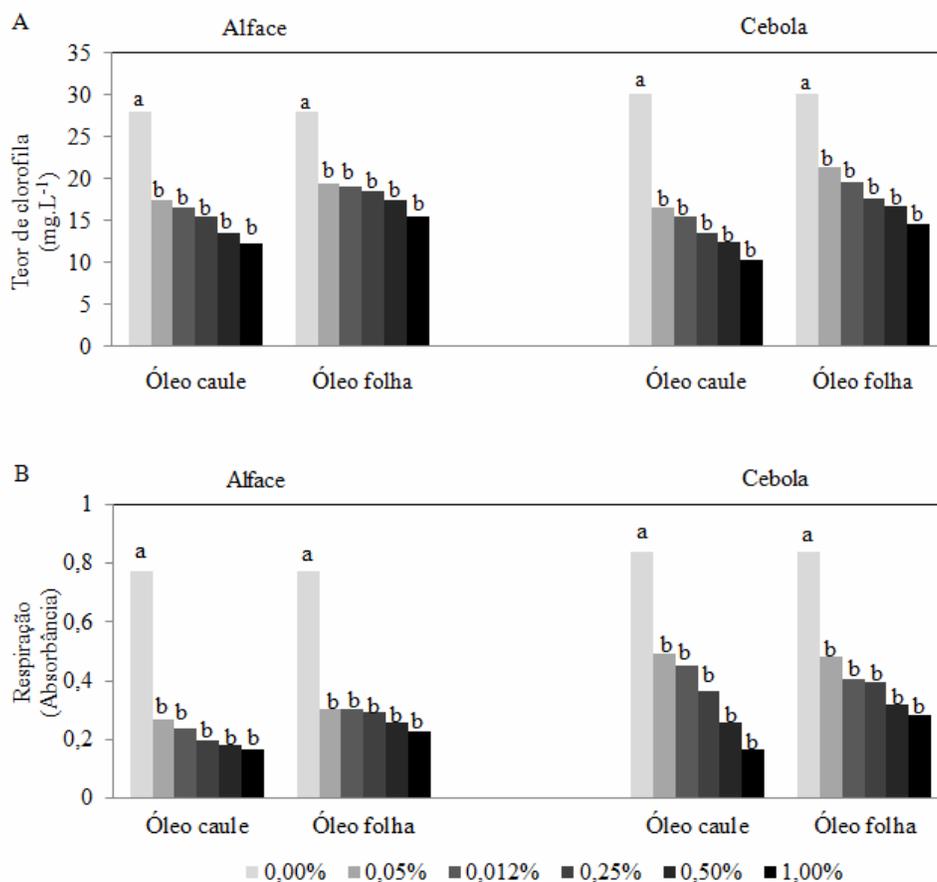


FIGURA 6. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de *C. doctoris* sobre o teor médio de clorofila total na parte aérea (A) e respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

A atividade respiratória das células das raízes das plântulas sob os tratamentos com os óleos essenciais foi menor em comparação com o controle (Figura 6B) sendo as maiores reduções na concentração de 1% do óleo do caule que reduziu a respiração das raízes de alface em 78% e de cebola em 80%.

A atividade da peroxidase (POD) e catalase (CAT) aumentou em todas as concentrações dos tratamentos avaliados (Figura 7 A e B), sendo observado que, assim como nos outros parâmetros avaliados, a maior atividade dessas enzimas é verificada na maior concentração do óleo do caule.

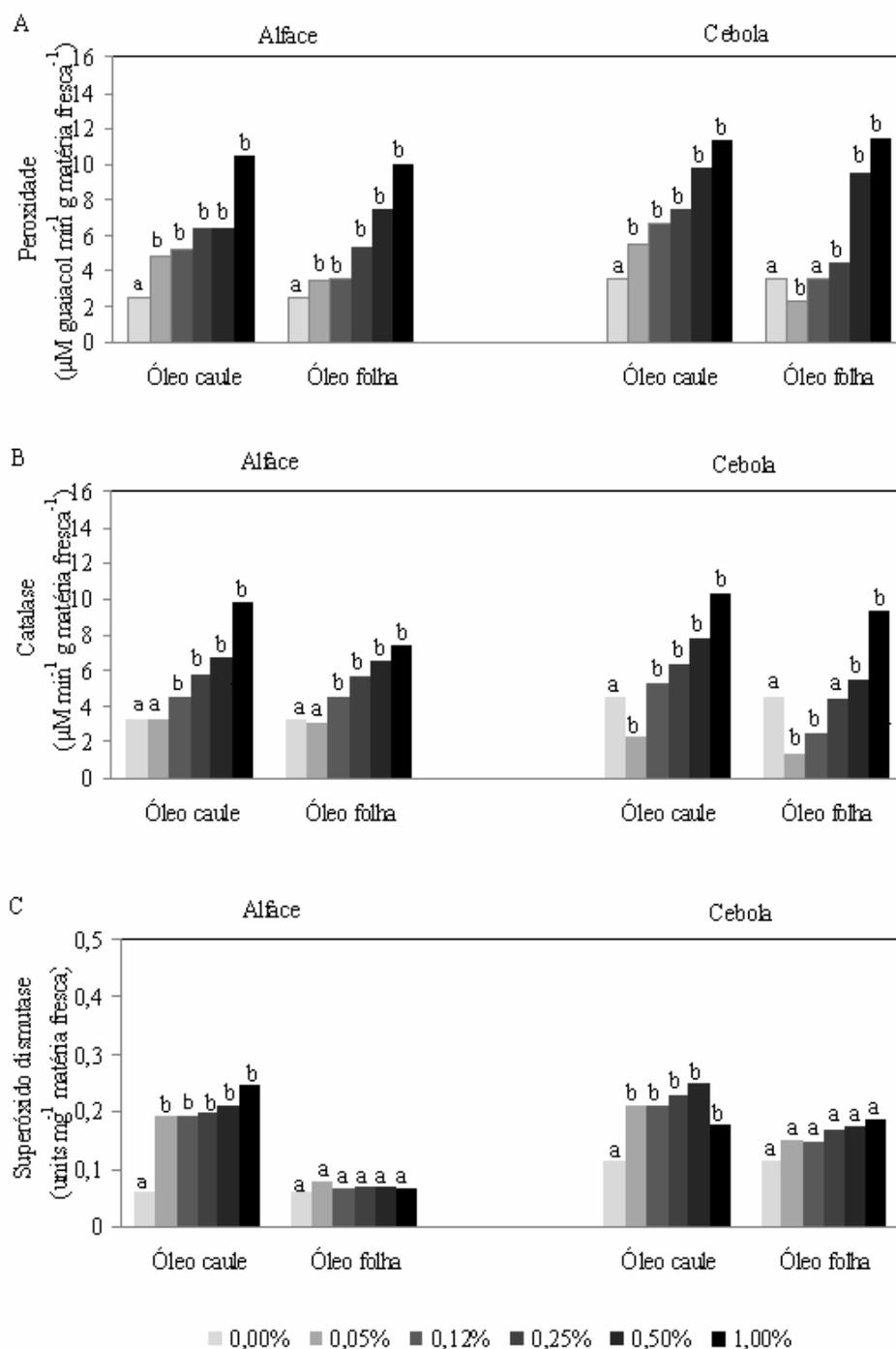


FIGURA 7. Efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais do caule e folha de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

Quanto aos resultados da avaliação referente a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 7C) foi observado aumento da atividade dessa enzima quando as plântulas de alface e cebola foram submetidas às concentrações dos óleos essenciais do caule.

O índice mitótico foi continuamente reduzido com o aumento da concentração dos óleos do caule e folhas de *C. doctoris* (Figura 8), com exceção da concentração de 0,12% do óleo da folha que elevou o valor do índice mitótico de alface e cebola. O maior efeito depressivo foi verificado para a concentração de 1% do óleo do caule, em que o índice mitótico não atingiu mais que 6,6% em alface (Figura 8 A) e 10,3% em cebola (Figura 8 B). Uma redução de 85% no índice mitótico de alface foi observada para a concentração de 1% do óleo do caule.

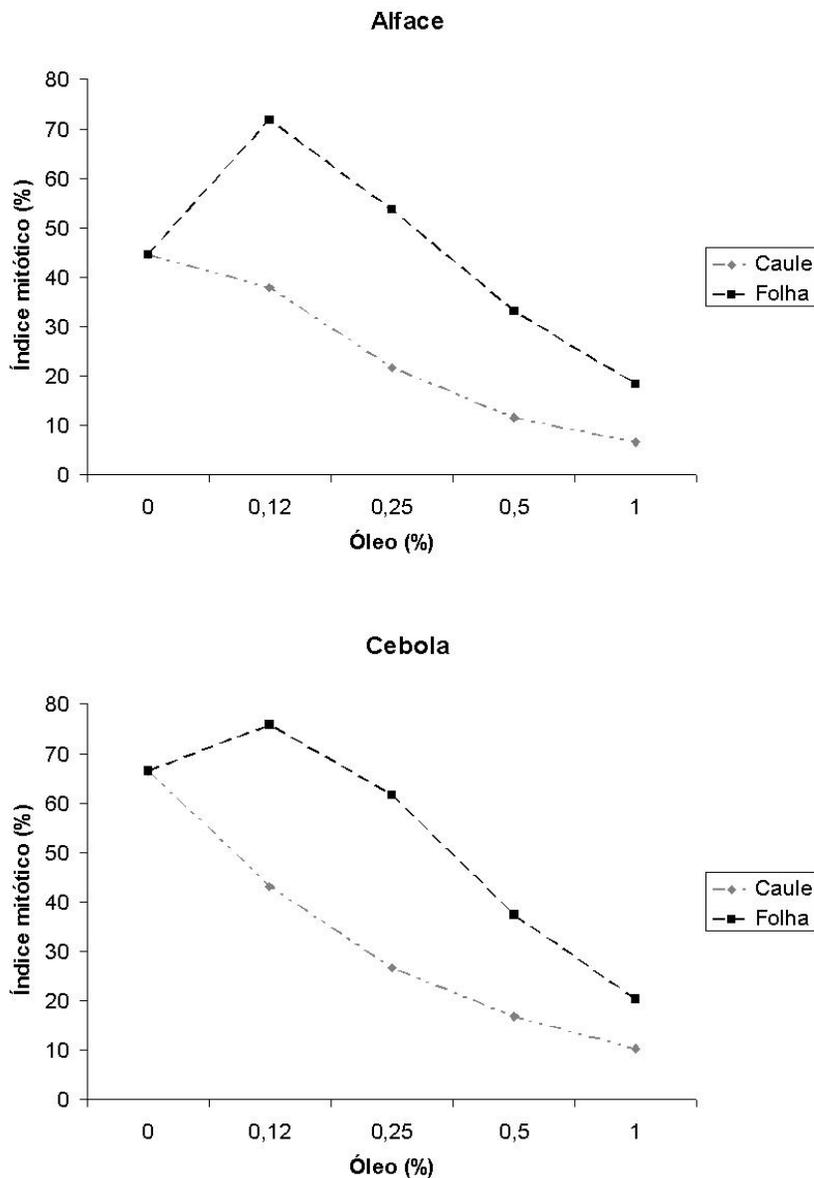


FIGURA 8. Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plantas de alfaca (*L. sativa*) e cebola (*A. cepa*) expostas a diferentes concentrações do óleo essencial do caule e folhas de *C. doctoris*.

Comparando-se as freqüências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento (Quadro 2) nota-se, em geral, maior freqüência da prófase e menor freqüências das outras fases subseqüentes. Nos resultados das observações citológicas observa-se que o óleo do caule apresentou os maiores efeitos fitotóxicos, verificando-se que o aumento da concentração do óleo do caule levou a uma drástica redução do índice

mitótico, com paralisação do crescimento radicular, em consequência principalmente da ausência da telófase.

QUADRO 2. Frequência das diferentes fases da mitose em células meristemáticas das raízes de plântulas de alface e cebola sob diferentes concentrações do óleo do caule e folhas de *Croton doctoris*

ÓLEO DO CAULE					
ALFACE	Número de células em mitose	Prófase	% das células nas fases		
Concentrações (%)			Metáfase	Anáfase	Telófase
0	133,66a	82,33a	25,00a	18,66a	7,66a
0,12	113,66a	56,66b	34,00b	23,00b	0,00b
0,25	65,33b	28,33b	25,00a	12,00b	0,00b
0,5	35,00b	12,33b	15,66b	7,00b	0,00b
1	20,00b	7,33b	11,00b	1,66b	0,00b
CEBOLA					
0	199,66a	121,66a	41,66a	23,66a	12,66a
0,12	129,66b	62,00b	44,00a	22,66a	1,00b
0,25	80,00b	29,66b	33,66b	16,00b	0,66b
0,5	50,33b	23,66b	20,00b	6,66b	0,00b
1	31,00b	12,66b	14,66b	3,66b	0,00b
ÓLEO DAS FOLHAS					
ALFACE	Número de células em mitose	Prófase	% das células nas fases		
Concentrações (%)			Metáfase	Anáfase	Telófase
0	133,66a	82,33a	25,00a	18,66a	7,66a
0,12	215,33b	61,66a	87,66b	64,33b	1,66b
0,25	161,00a	35,00b	76,33b	48,33b	1,33b
0,5	99,33b	18,33b	47,00b	34,00b	0,00b
1	55,33b	12,33b	26,33a	16,66a	0,00b
CEBOLA					
0	199,66a	121,66a	41,66a	23,66a	12,66a
0,12	227,33b	54,33b	95,33b	74,00b	3,66b
0,25	185,00a	35,33b	83,66b	63,66b	2,33b
0,5	112,00b	22,66b	51,33b	37,66b	0,33b
1	61,00b	16,66b	23,33b	20,00a	1,00b

Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

2. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de *C. doctoris* em laboratório

Nos resultados de germinação (Quadro 3), observa-se que o extrato etanólico bruto (EEB) e as frações semipurificadas (FS) do caule e folhas de *C. doctoris* reduziram o índice de velocidade de germinação (IVG) e inibiram a porcentagem final de germinação de alface e cebola. Nesses resultados, os maiores efeitos fitotóxicos foram verificados na fração acetato de etila (FAE) do caule (FAEC) e das folhas (FAEF), que inibiram em 32% a porcentagem de germinação, em média, de alface e cebola, em comparação ao controle.

QUADRO 3. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC/EEBF), frações hexânica (FHC/FHF), fração acetato de etila (FAEC/FAEF) e fração etanol-água (FEAC/FEAF) do caule e folhas de *Croton doctoris* sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface e cebola

Caule				Folhas			
Índice de velocidade de germinação (IVG)				Índice de velocidade de germinação (IVG)			
Tratamento	250	500	1.000	Tratamento	250	500	1.000
¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Alface; Controle: 25,13							
EEBC	23,93 ^{ns}	24,00 ^{ns}	19,68*	EEBF	23,02*	19,71*	18,47*
FHC	21,53*	20,63*	16,65*	FHF	23,04*	21,46*	19,79*
FAEC	20,46*	21,50*	14,57*	FAEF	26,22 ^{ns}	23,58*	17,49*
FEAC	21,57*	20,34*	18,62*	FEAF	23,79 ^{ns}	23,17*	21,70*
Cebola; Controle: 33,63							
EEBC	37,06*	37,03*	29,51*	EEBF	31,65*	25,44*	21,27*
FHC	29,55*	25,24*	19,76*	FHF	30,42*	28,43*	24,24*
FAEC	28,42*	23,81*	14,44*	FAEF	24,39*	23,39*	20,21*
FEAC	30,25*	25,24*	21,51*	FEAF	32,44*	30,33*	26,48*
Germinabilidade (%G)				Germinabilidade (%G)			
Alface; Controle: 100,00							
EEBC	98,50 ^{ns}	99,50 ^{ns}	99,00 ^{ns}	EEBF	100,00 ^{ns}	98,00 ^{ns}	95,50*
FHC	86,50*	82,50*	72,00*	FHF	88,00*	84,00*	73,50*
FAEC	79,00*	71,00*	64,50*	FAEF	81,50*	75,00*	66,00*
FEAC	84,50*	80,50*	75,00*	FEAF	86,50*	81,50*	72,50*
Cebola; Controle: 99,00							
EEBC	93,00 ^{ns}	87,50*	85,50*	EEBF	85,50*	83,50*	81,50*
FHC	81,50*	77,50*	71,00*	FHF	94,50 ^{ns}	87,00*	84,50*
FAEC	89,50*	72,50*	65,00*	FAEF	85,50*	82,50*	75,00*
FEAC	93,00*	83,00*	77,00*	FEAF	94,50 ^{ns}	93,00*	90,50*

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet. ^{ns}A média do tratamento não difere significativamente da média do controle.

Nos resultados de crescimento (Figura 9 e 10), verifica-se que o EEB e as FS do caule e folhas inibiram o crescimento da raiz, hipocótilo/coleótilo e reduziram o acúmulo de massa seca de alface e cebola. Os efeitos inibitórios mais acentuados foram evidenciados para a concentração de 1.000 mg.L⁻¹ da FAEC e FAEF tanto em alface quanto em cebola. Sendo que a FAEC apresentou maior fitotoxicidade em relação a FAEF, inibindo o crescimento da raiz (47%; 37%), hipocótilo (82%; 49%) e reduzindo o acúmulo de massa seca (49%; 55%) de alface e cebola, respectivamente.

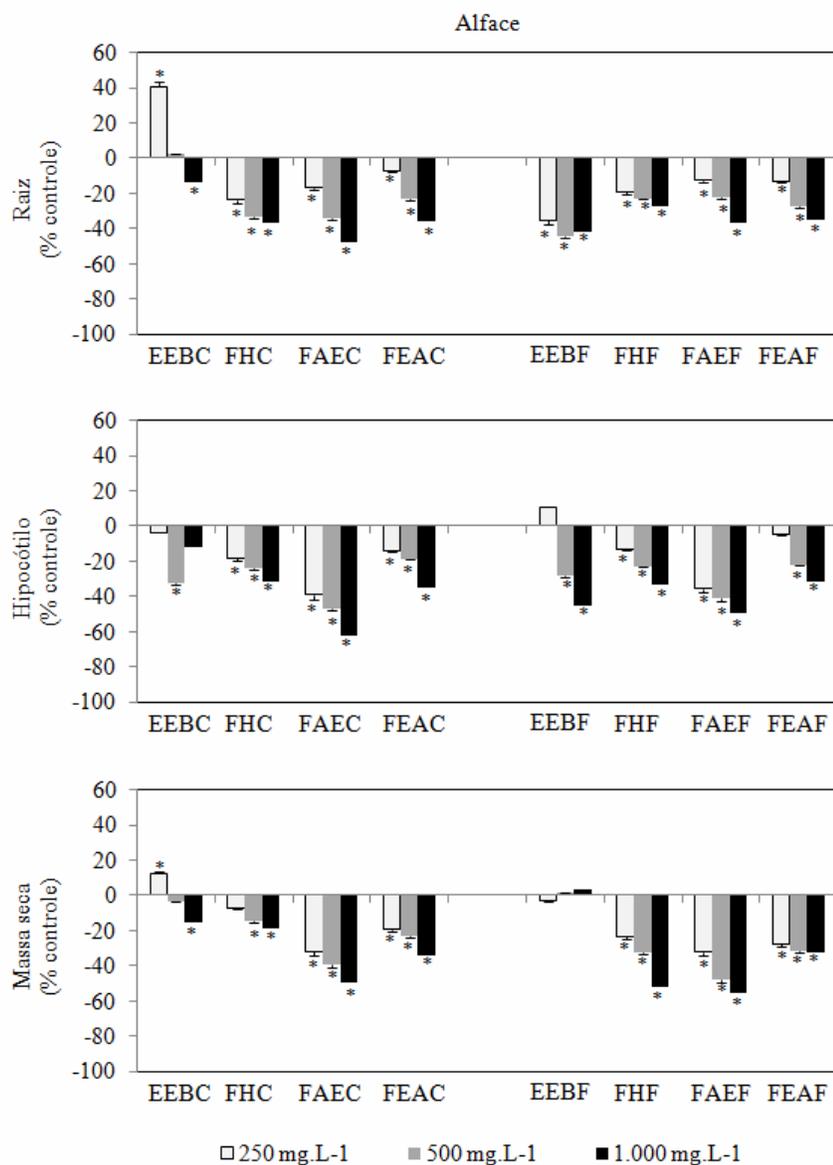


FIGURA 9. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC, EEBF), fração hexânica (FHC, FHF), fração acetato de etila (FAEC, FAEF) e fração etanol-água (FEAC, FEAF) do caule e folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz, hipocótilo e massa seca das plântulas de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

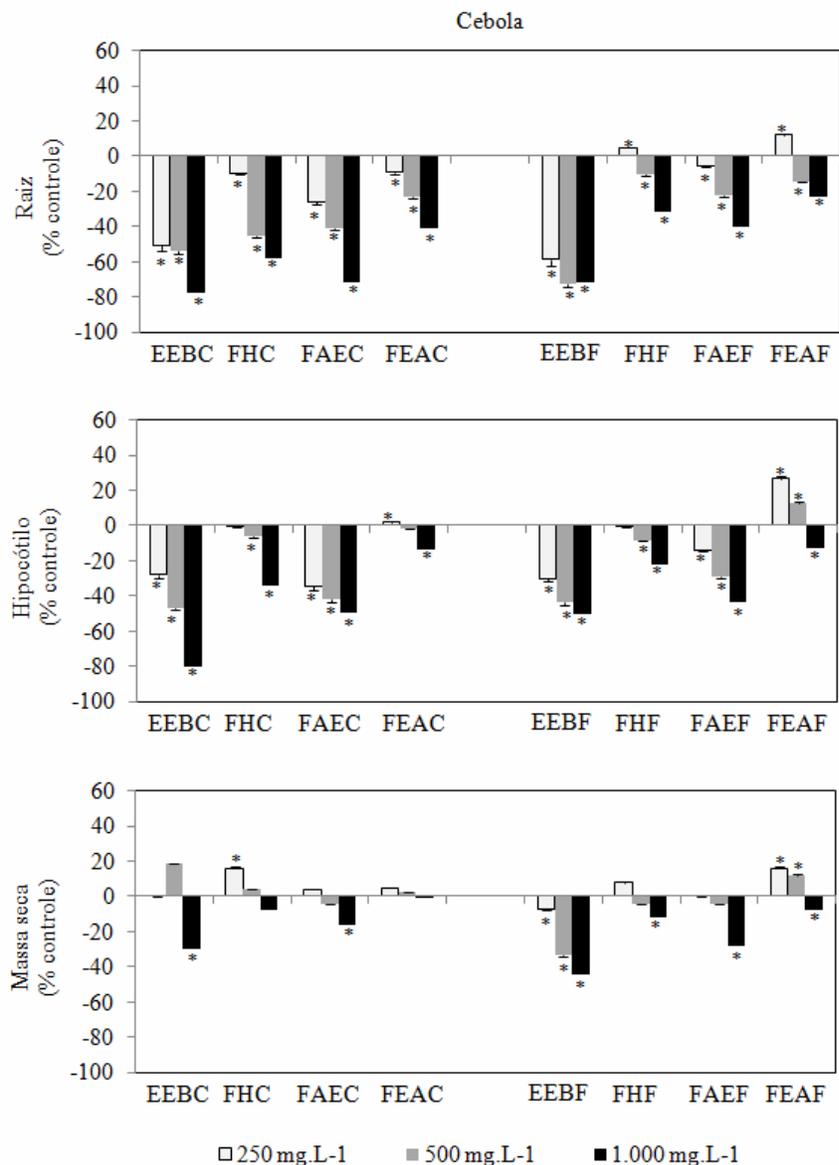


FIGURA 10. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEBC, EEBF), fração hexânica (FHC, FHF), fração acetato de etila (FAEC, FAEF) e fração etanol-água (FEAC, FEAF) do caule e folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz, hipocótilo e massa seca das plântulas de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

De acordo com os resultados obtidos de germinação e crescimento inicial, foi selecionada a FAE do caule e folhas de *C. doctoris*. Essa fração provocou maior inibição na germinação e no crescimento de alface e cebola, e portanto, foi considerada

a mais ativa, comparativamente as demais frações. Com base nisso, avaliou-se num segundo bioensaio o efeito da FAEC e FAEF de *C. doctoris* sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

A produção de clorofila das plântulas de alface e cebola (Figura 11 A e 12 A) foi inibida por todas as concentrações avaliadas da FAEC e FAEF, sendo as maiores reduções nos teores de clorofila total observadas quando as plântulas foram submetidas a concentração de 1.000 mg.L^{-1} da FAEC, que reduziu a clorofila total de alface em 53% e de cebola em 70% (Figura 11 A), tendo como base de comparação o controle. Não houve diferença significativa no teor de clorofila em crambe, corda de viola, trigo e brachiaria.

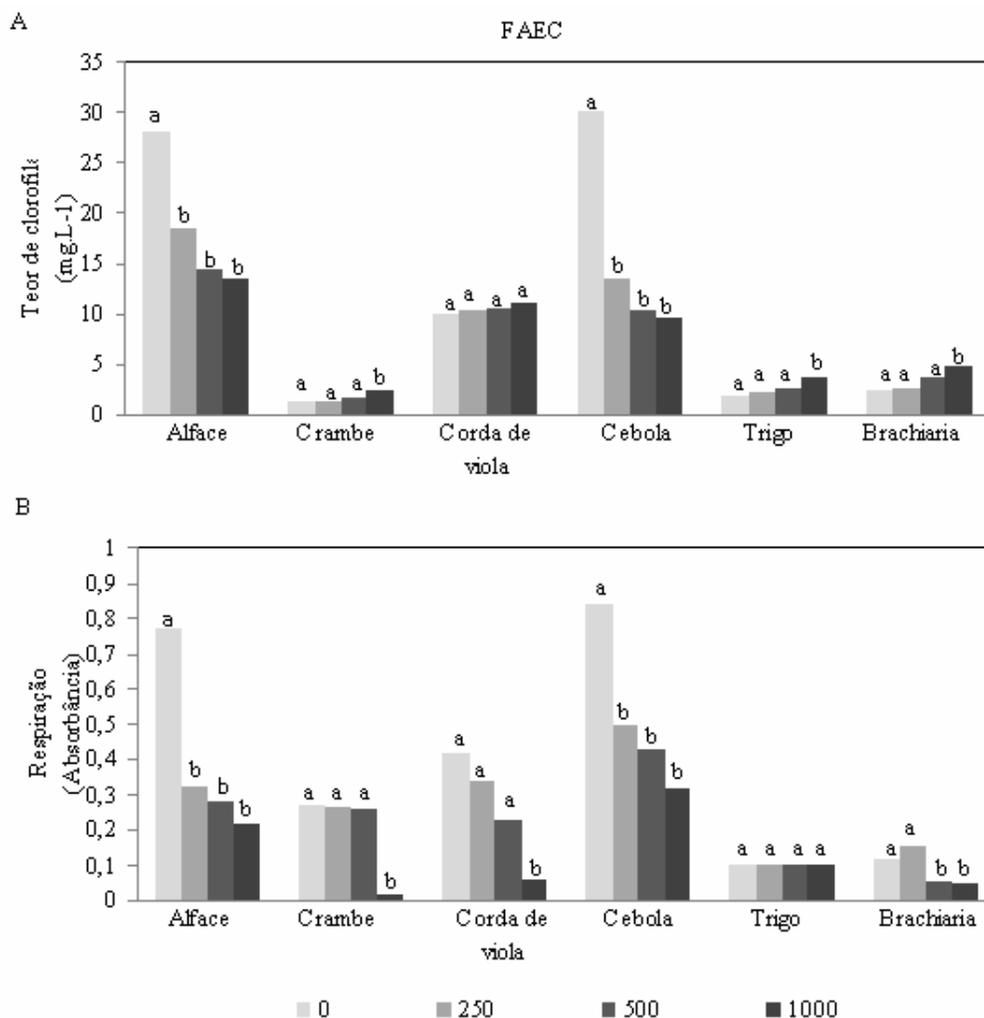


FIGURA 11. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) de *C. doctoris* sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface, crambe, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

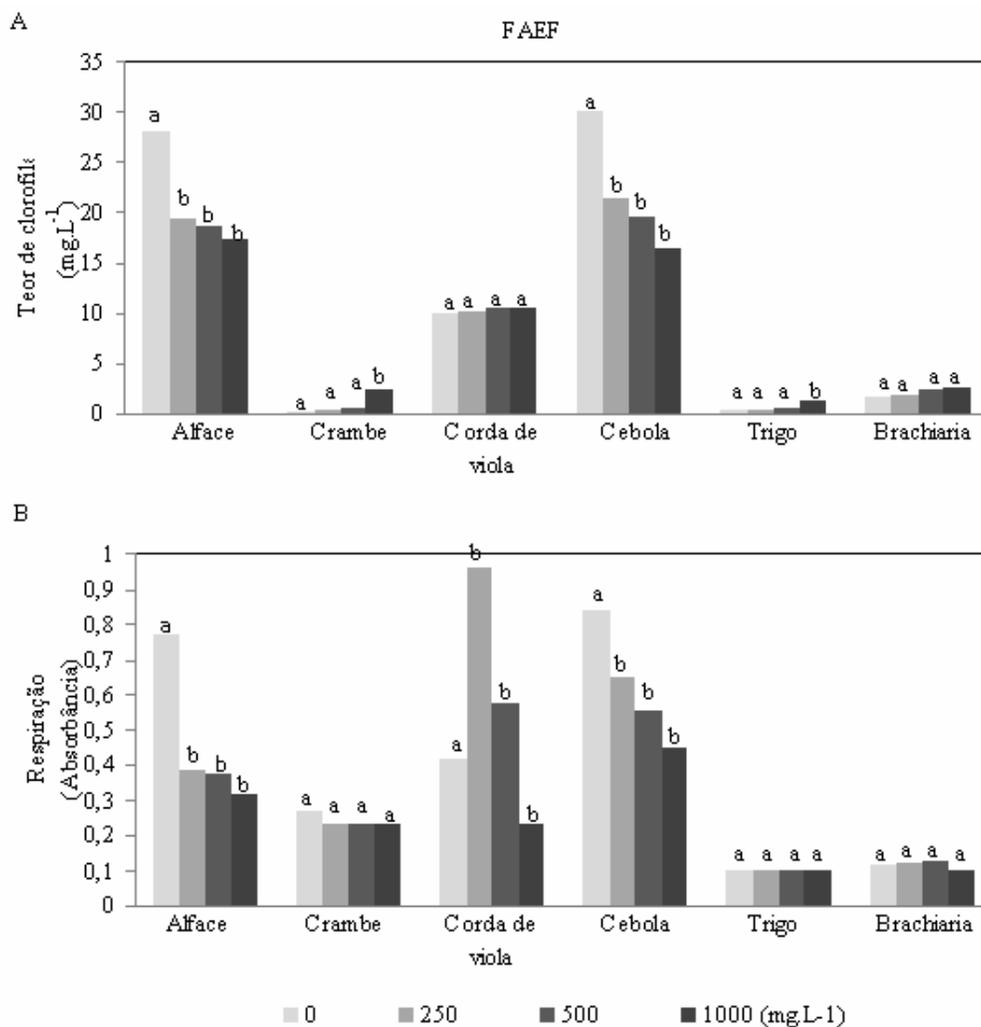


FIGURA 12. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila das folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial nas raízes (B) das plântulas de alface, crambe, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

Com relação aos resultados da atividade respiratória das raízes das plântulas-teste, verifica-se que a FAEC (Figura 11 B) reduziu a atividade respiratória das plântulas de alface, crambe, corda de viola, cebola e brachiaria. Já FAEF (Figura 12 B) reduziu a atividade respiratória de alface, corda de viola e cebola. As maiores reduções foram verificadas na concentração de 1.000 mg.L⁻¹ da FAEC, sendo essas reduções de 95% em crambe e 86% em corda de viola.

A atividade da peroxidase (POD) aumentou em alface, crambe, corda de viola, cebola e brachiaria quando as plântulas foram submetidas a FAEC (Figura 13 A), sendo as maiores atividades da POD verificadas em alface, crambe e cebola que aumentaram, em média, em 330%, em comparação ao controle. A FAEF aumentou a atividade da POD em todas as plântulas teste (Figura 14A), sendo os maiores aumentos verificados em alface, crambe e cebola, em média de 240%.

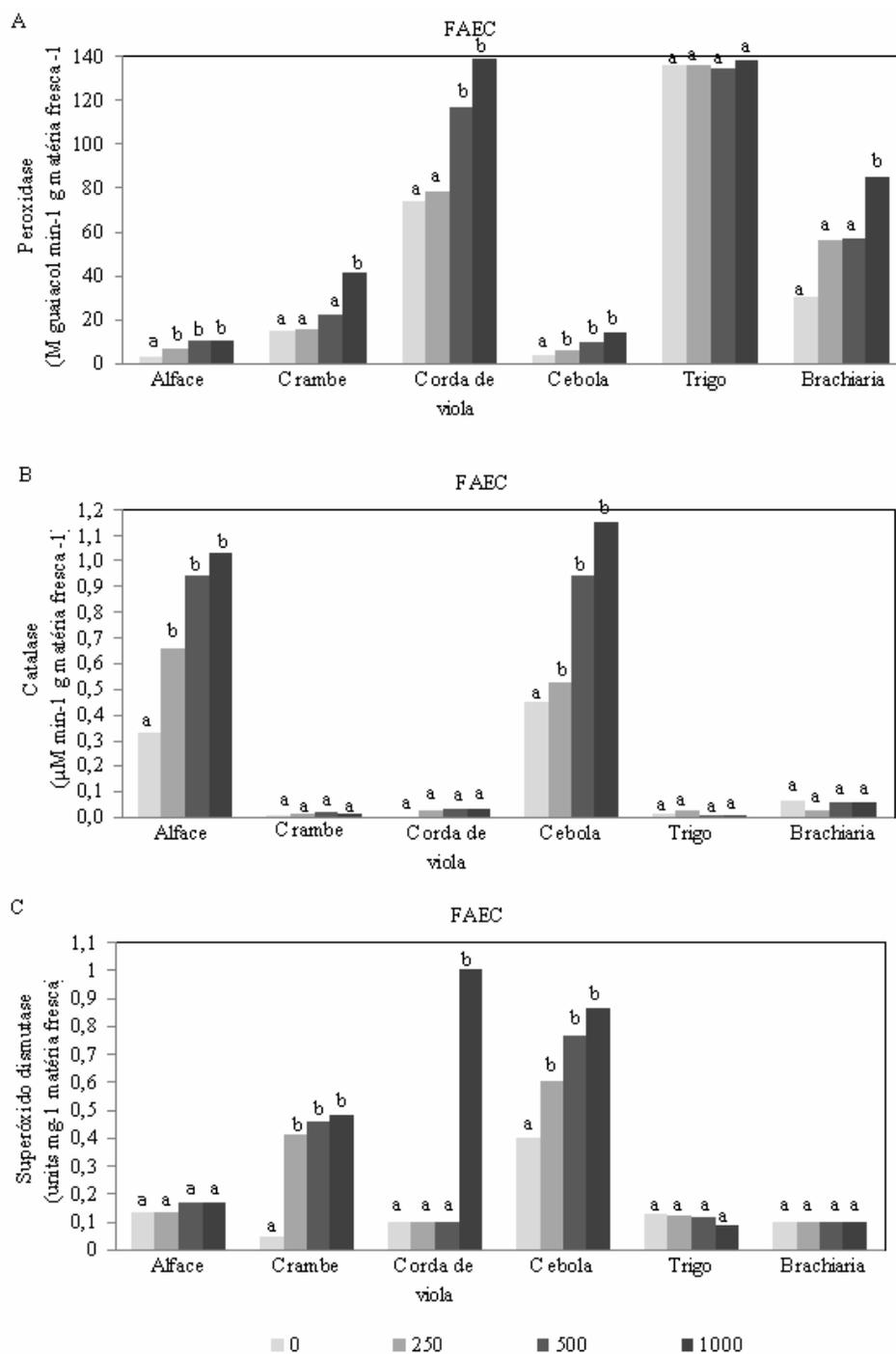


FIGURA 13. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface, crambe, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

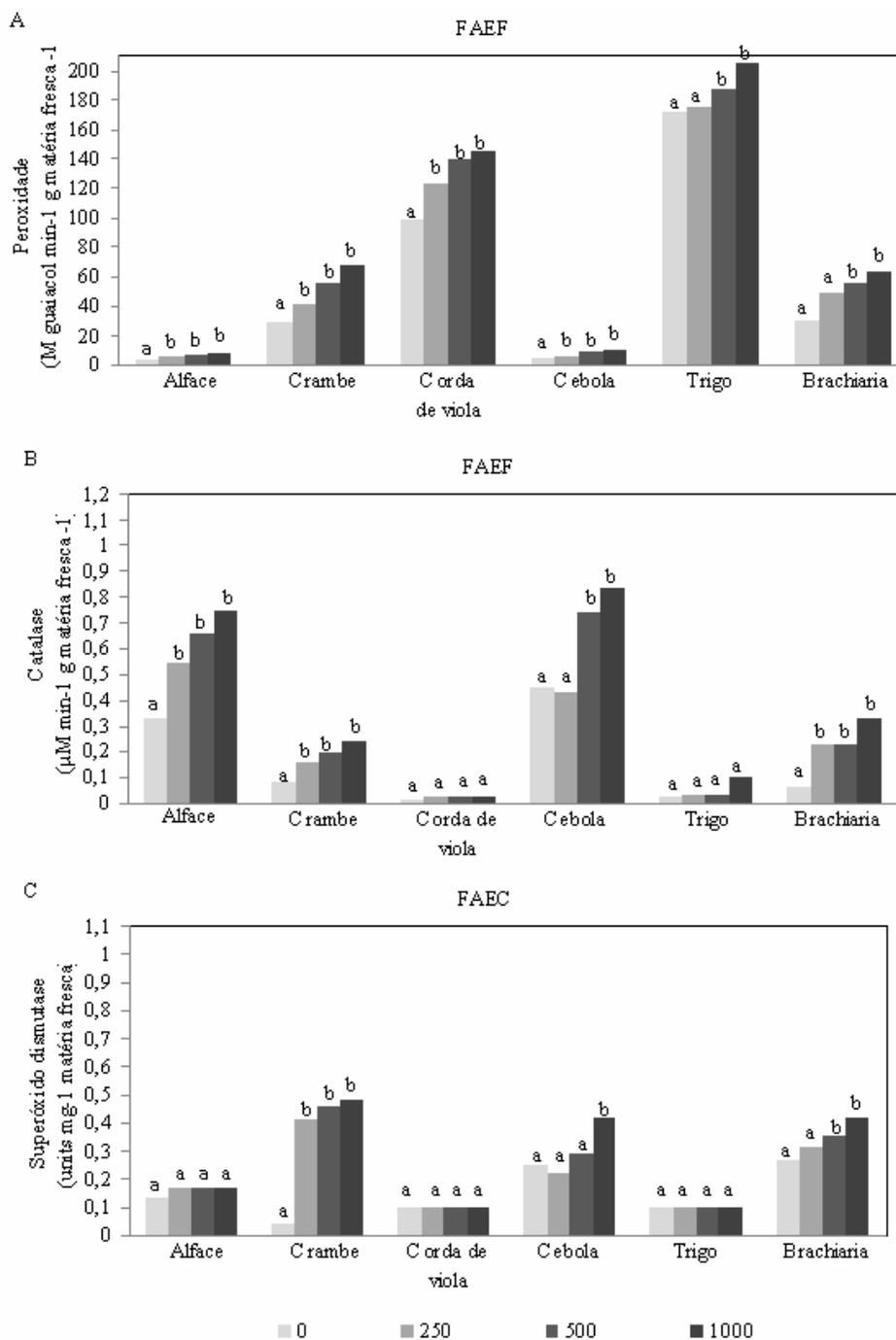


FIGURA 14. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila das folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) das plântulas de alface, crambe, corda de viola, cebola, trigo e brachiaria. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

A FAEC aumentou a atividade da catalase (CAT) de alface e cebola (Figura 13B) em média de 237%, em comparação ao controle. Já FAEF aumentou a atividade da CAT (Figura 14B) de alface, crambe, cebola e brachiaria, sendo os maiores aumentos verificados em crambe e brachiaria ($\pm 365\%$).

Com relação a atividade da superóxido dismutase (SOD) verifica-se que a FAEC aumentou a atividade da SOD em crambe, corda-de-viola e cebola (Figura 13C) e a FAEF aumentou a SOD em crambe, cebola e brachiaria (Figura 14C). Sendo os maiores aumentos verificados em crambe.

O índice mitótico foi continuamente reduzido com o aumento da concentração da FAEC e FAEF de *C. doctoris* (Figura 15). O maior efeito depressivo foi verificado para a concentração de 1.000 mg.L^{-1} da FAEC, em que o índice mitótico não atingiu mais do que 9,6% em alface e 46,3% em cebola. A maior redução no índice mitótico foi verificado em alface, onde observa-se que a concentração de 1.000 mg.L^{-1} da FAEC reduziu em 85% no índice mitótico de alface, em comparação ao controle.

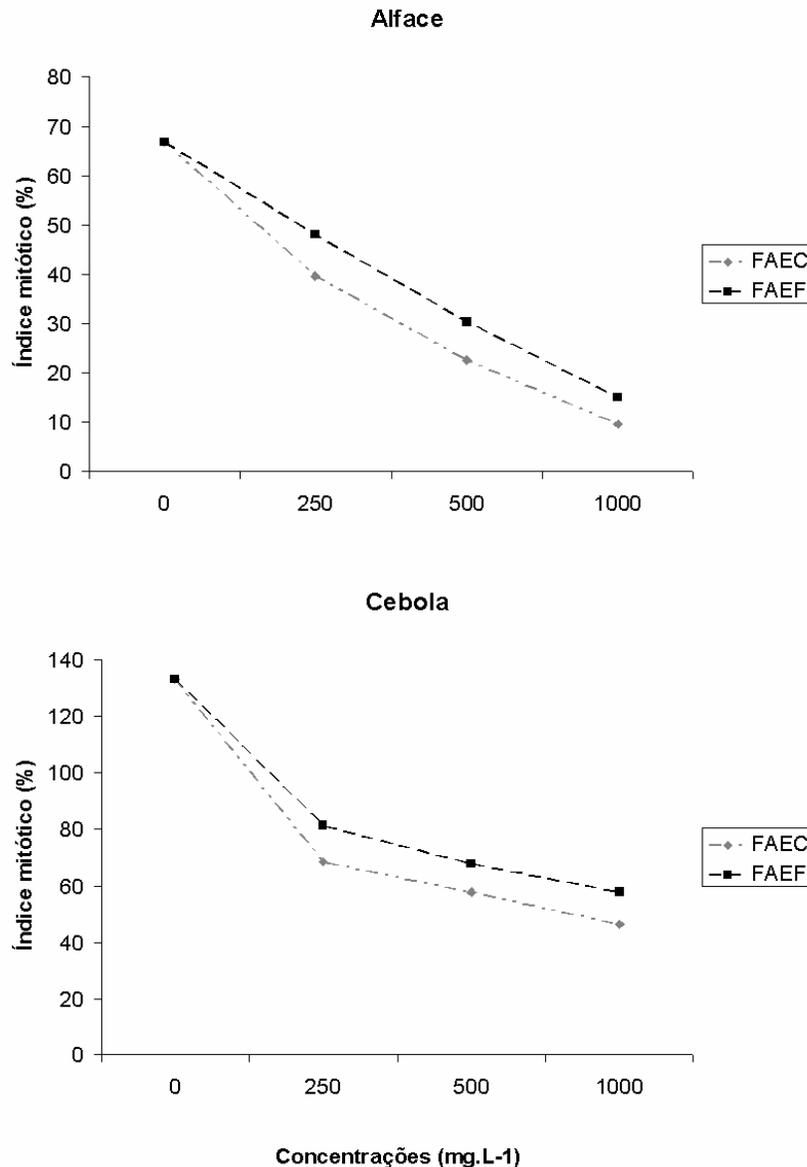


FIGURA 15. Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plantas de alface (*L. sativa*) e cebola (*A. cepa*) expostas a diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris*.

Comparando-se a frequência das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento (Quadro 4) nota-se, em geral, maior frequência da prófase e menor frequência das outras fases subseqüentes. Nos resultados observa-se que a FAEC apresentou os maiores efeitos fitotóxicos, verificando-se que o aumento da concentração levou a uma drástica redução do índice mitótico, com paralisação do crescimento radicular, em consequência principalmente da ausência da telófase.

QUADRO 4. Frequência das diferentes fases da mitose em células meristemáticas das raízes de plântulas de alface e cebola sob diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e das folhas (FAEF) de *Croton doctoris*

		FAEC			
ALFACE	Número de células em mitose	% das células nas fases			
Concentrações (mg.L ⁻¹)		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
0	133,66	82,33	25,00	18,66	7,66
250	79,33*	69,66*	8,00*	3,33*	0,00*
500	45,33*	37,33*	4,66*	1,66*	0,00*
1000	19,33*	18,66*	0,66*	0,00*	0,00*
+CEBOLA					
0	266,33	159,33	63,00	34,00	10,00
250	136,66*	69,66*	56,33*	10,66*	0,00*
500	115,33*	64,66*	42,33*	8,33*	0,00*
1000	92,66*	53,00*	36,00*	3,66*	0,00*
		FAEF			
ALFACE	Número de células em mitose	% das células nas fases			
Concentrações (mg.L ⁻¹)		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
0	133,66	82,33	25,00	18,66	7,66
250	96,00*	75,33*	13,33*	6,33*	2,00*
500	60,66*	48,33*	6,00*	4,33*	1,00*
1000	30,33*	28,00*	1,33*	0,33*	0,66*
CEBOLA					
0	266,33	159,33	66,33	34,00	10,00
250	163,00*	79,33*	63,00*	16,66*	0,66
500	135,66*	71,33*	53,33*	10,66*	0,33
1000	115,66*	64,00*	43,66*	8,00*	0,00

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet. ^{ns}A média do tratamento não difere significativamente da média do controle.

3. Atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS) de *C. doctoris* em casa de vegetação

Nos resultados de fitotoxicidade, do primeiro bioensaio, verifica-se que o extrato etanólico bruto (EEB) do caule e folhas e as frações semipurificadas (FS) das folhas inibiram o crescimento da raiz e parte aérea de alface (Figura 16A e B). Nesses resultados foram verificados os maiores efeitos inibitórios na concentração de 1.000 mg.L⁻¹ da fração acetato de etila das folhas (FAEF) que inibiu o crescimento da raiz

(41%) e da parte aérea (58%) e reduziu o acúmulo de massa seca da raiz (33%) e parte aérea (35%), em relação ao controle.

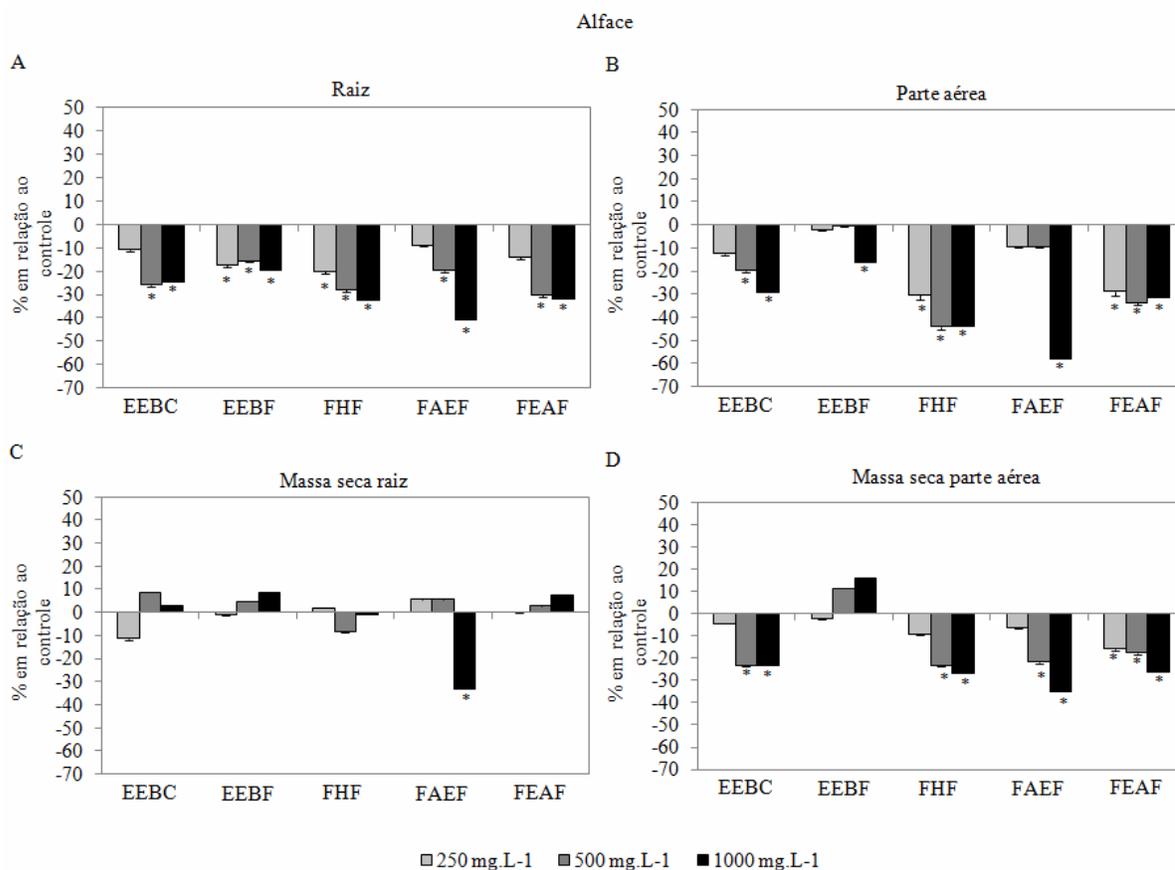


FIGURA 16. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de alface. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnett.

A FAEF também inibiu o crescimento da parte aérea do capim marmelada (25%; 1000 mg.L⁻¹) (Figura 19 B) e reduziu o acúmulo de massa seca da parte aérea da corda de viola (60%; 1000 mg.L⁻¹) (Figura 17 D), cebola (53%; 1000 mg.L⁻¹) (Figura 18 D) e capim marmelada (34%; 1000 mg.L⁻¹) (Figura 19 D). A FAEF causou as maiores

reduções no acúmulo de massa seca das raízes na concentração de 1000 mg.L⁻¹ das plântulas de alface (33%), cebola (15%) e capim marmelada (45%).

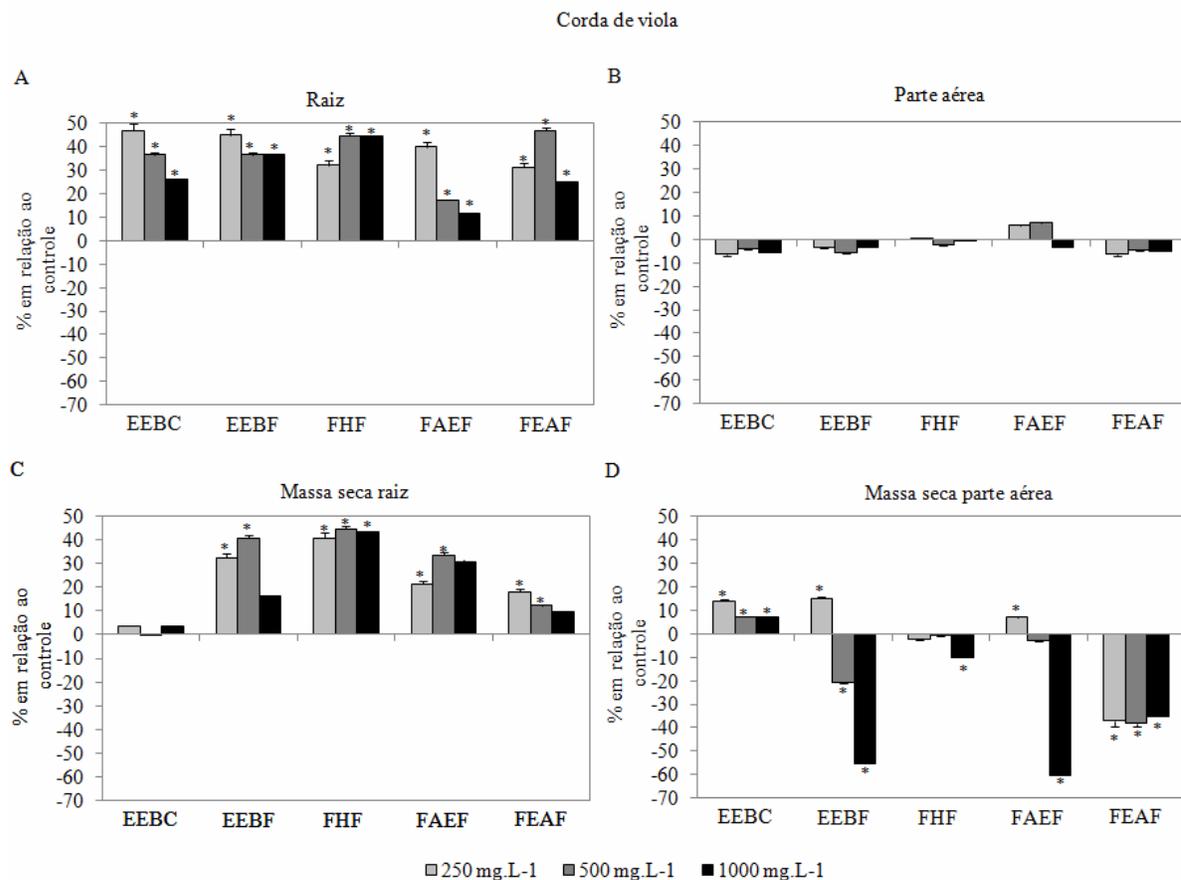


FIGURA 17. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de corda de viola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

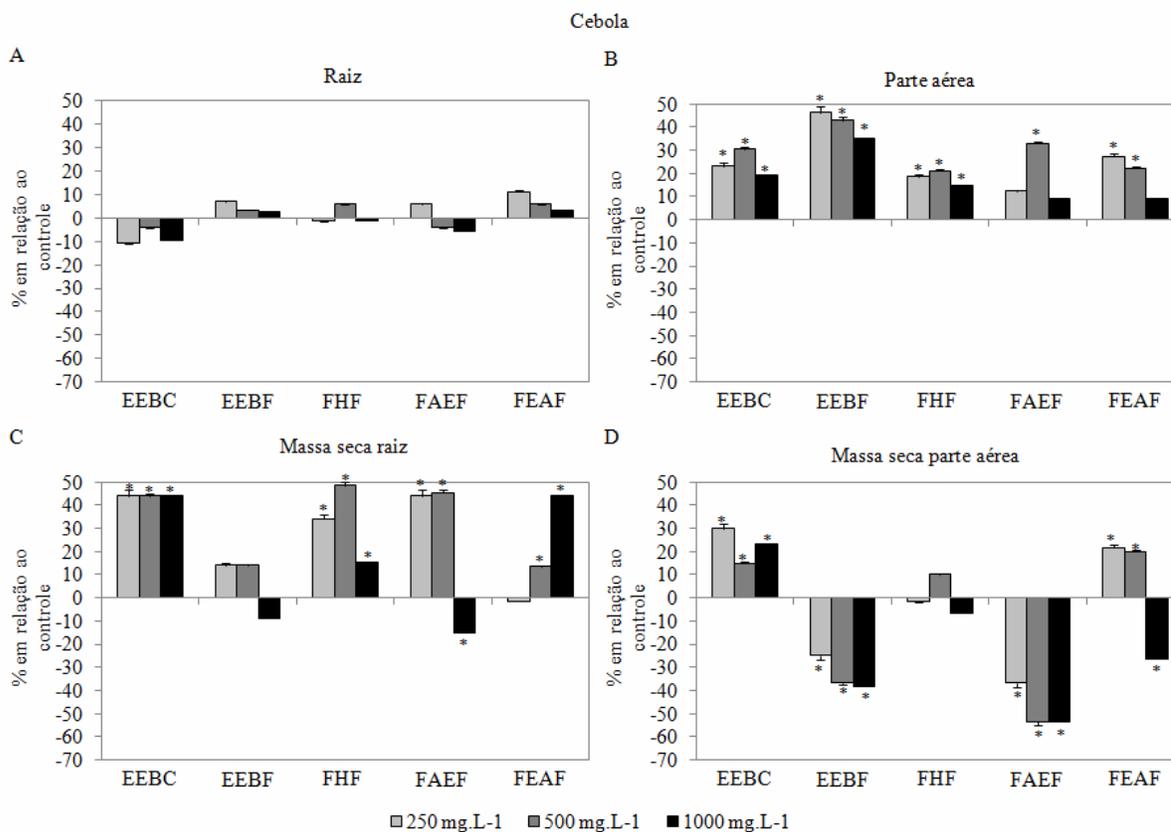


FIGURA 18. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de cebola. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

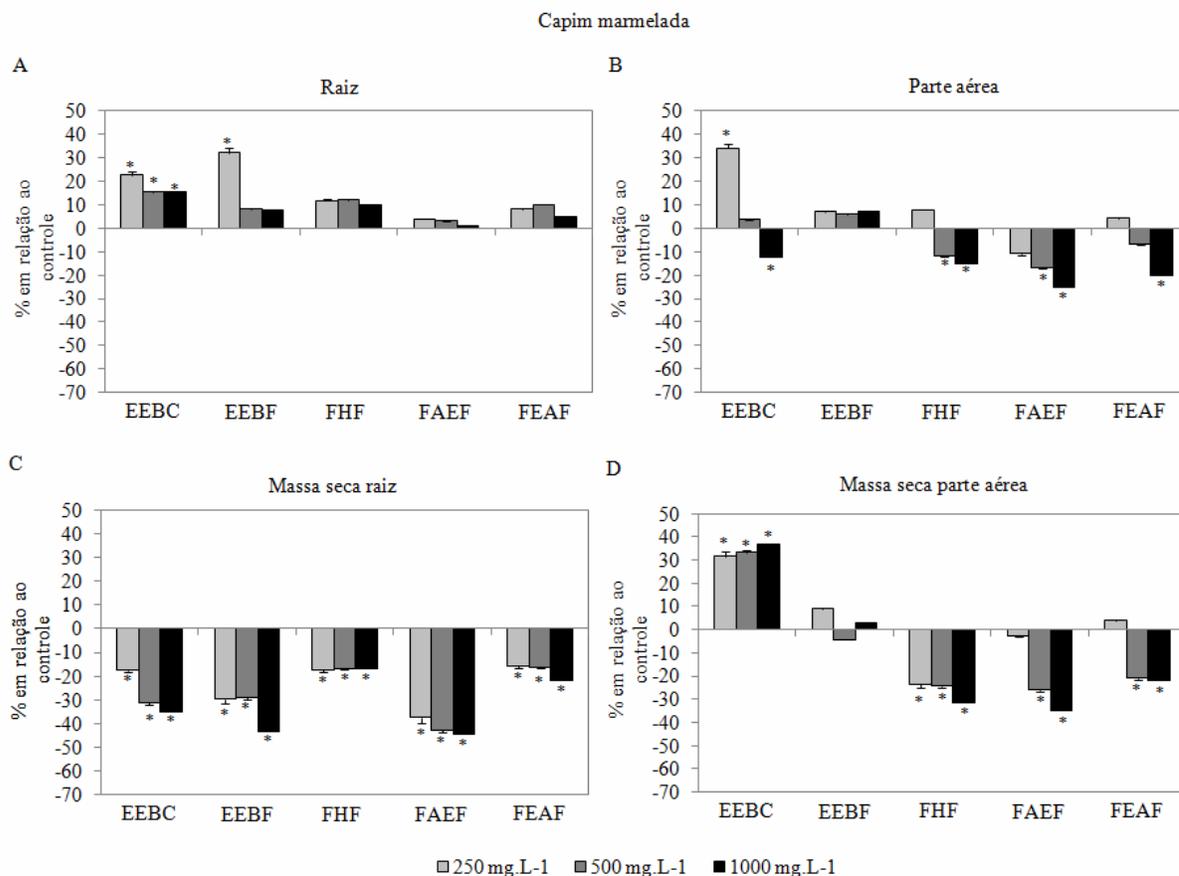


FIGURA 19. Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto do caule (EEBC) e extrato etanólico bruto (EEBF), fração hexânica (FHF), fração acetato de etila (FAEF) e fração etanol-água (FEAF) das folhas de *C. doctoris* sobre o crescimento da raiz (A), parte aérea (B) e massa seca da raiz (C) e parte aérea (D) de capim marmelada. Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

De acordo com os resultados obtidos de crescimento, foi selecionada a FAE obtida do EEB das folhas de *C. doctoris* como o tratamento que apresentou a maior fitotoxicidade nos parâmetros avaliados. Essa fração provocou maior inibição no crescimento de alface e capim marmelada e maiores reduções no acúmulo de massa seca de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada e, portanto, foi considerada a mais ativa, comparativamente as demais frações. Com base nisso, avaliou-se num

segundo bioensaio o efeito da fração acetato de etila do caule (FAEC) e FAEF de *C. doctoris* sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

A taxa de fotossíntese (Quadro 5) reduziu em alface e cebola quando foram submetidas a maior concentração avaliada da FAEC e FAEF. As maiores reduções foram verificadas na FAEC que reduziu a taxa de fotossíntese de alface em 120% e de cebola em 76%. Nenhum efeito significativo foi verificado na transpiração e condutância estomática.

QUADRO 5. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada

Taxa de fotossíntese ($\mu\text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹	Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Alface				Corda de viola			
Controle:	4,95			Controle:	2,02		
FAEC	5,76 ^{ns}	2,11*	1,09*	FAEC	3,68*	4,73*	5,82*
FAEF	2,56*	2,65*	1,47*	FAEF	2,14 ^{ns}	1,65 ^{ns}	1,66 ^{ns}
Cebola				Capim marmelada			
Controle:	2,05			Controle:	1,61		
FAEC	6,04*	3,46*	0,48*	FAEC	1,09 ^{ns}	2,11*	2,11*
FAEF	4,46*	3,04*	0,50*	FAEF	2,56*	1,45 ^{ns}	2,65*
Transpiração ($\text{M mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹	Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Alface				Corda de viola			
Controle:	0,92			Controle:	0,67		
FAEC	0,97 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,91 ^{ns}	FAEC	0,47 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,63 ^{ns}
FAEF	1,17 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,84 ^{ns}	FAEF	0,59 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,56 ^{ns}
Cebola				Capim marmelada			
Controle:	0,6600			Controle:	0,84		
FAEC	0,51 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,55 ^{ns}	FAEC	0,97 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,91 ^{ns}
FAEF	0,52 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,55 ^{ns}	FAEF	0,97 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,84 ^{ns}
Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹	Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Alface				Corda de viola			
Controle:	0,03			Controle:	0,20		
FAEC	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	FAEC	0,13 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,20 ^{ns}
FAEF	0,03 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	FAEF	0,20 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,13 ^{ns}
Cebola				Capim marmelada			
Controle:	0,20			Controle:	0,03		
FAEC	0,15 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,15 ^{ns}	FAEC	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}
FAEF	0,16 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,16 ^{ns}	FAEF	0,06 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet. ^{ns}A média do tratamento não difere significativamente da média do controle.

A produção de clorofila das plantas de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada (Figura 20A) foram reduzidas pelas maiores concentrações avaliadas da FAEC e FAEF, sendo as maiores reduções observadas na concentração de 1.000 mg.L⁻¹ de alface ($\pm 51,5\%$) e corda de viola ($\pm 69\%$).

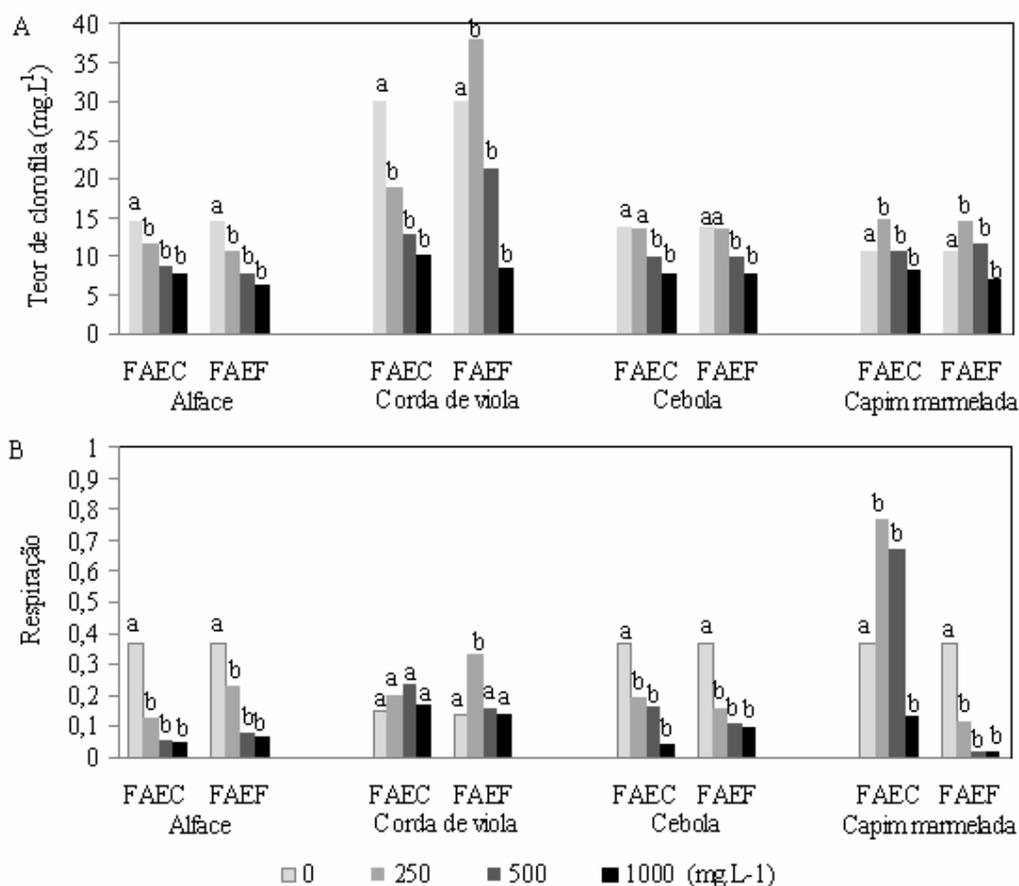


FIGURA 20. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre o teor de clorofila total na parte aérea (A) e a respiração potencial das raízes (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

A atividade respiratória (Figura 20B) das raízes foi inibida quando as plantas de alface, cebola e capim marmelada foram submetidas as maiores concentrações da FAEC e FAEF. Nesses resultados, verifica-se que a concentração de 1.000 mg.L⁻¹ inibiu a respiração potencial das raízes em valores superiores a 60%, em comparação ao controle. As maiores inibições foram verificadas na FAEC em alface (87%) e cebola (89%) e na FAEF em capim marmelada (96%).

A atividade da peroxidase (POD) aumentou nas maiores concentrações avaliadas da FAEC e FAEF tanto na parte aérea (Figura 21A) como na raiz (Figura 21B) em todas as plantas-alvo avaliadas, exceto na FAEF sobre a atividade em células de raízes de capim marmelada. Os maiores aumentos foram verificados na parte aérea de capim marmelada onde se verifica um aumento de $\pm 400\%$ na atividade da peroxidase tanto na FAEC quanto na FAEF.

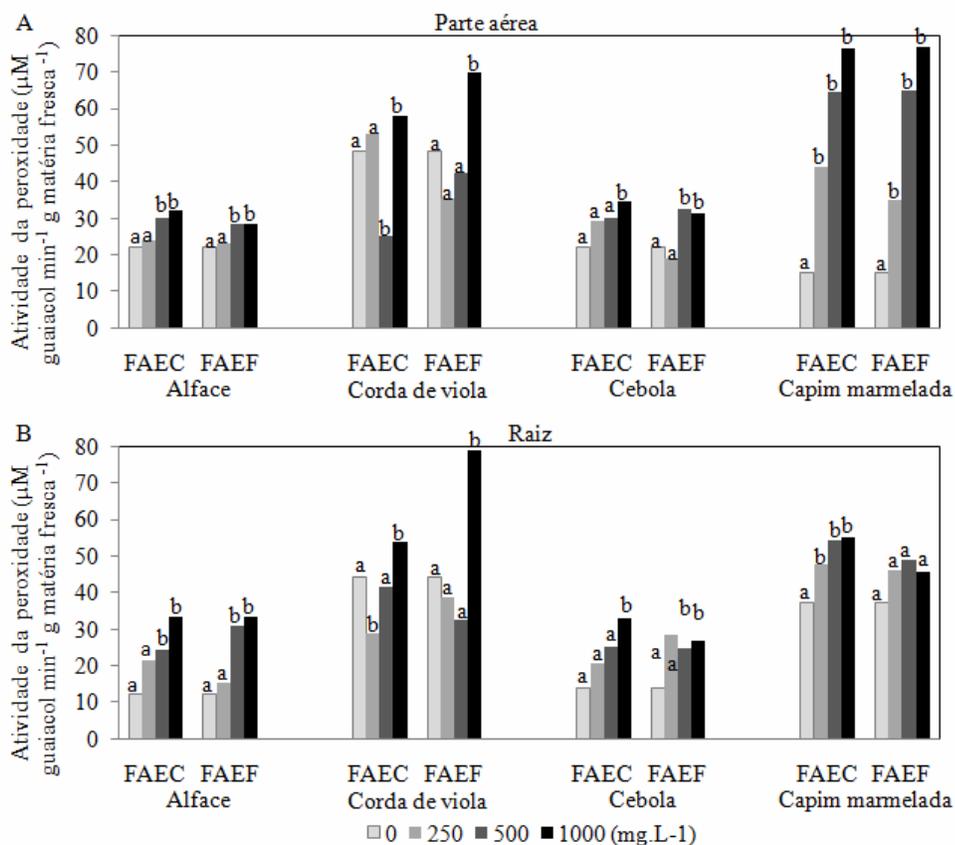


FIGURA 21. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da peroxidase da parte aérea (A) e raiz (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

A atividade da catalase (Figura 22) aumentou apenas na FAEF em cebola (1.000 mg.L⁻¹) e na FAEC e FAEF de capim marmelada (1.000 mg.L⁻¹), em média $\pm 750\%$ em relação ao tratamento controle.

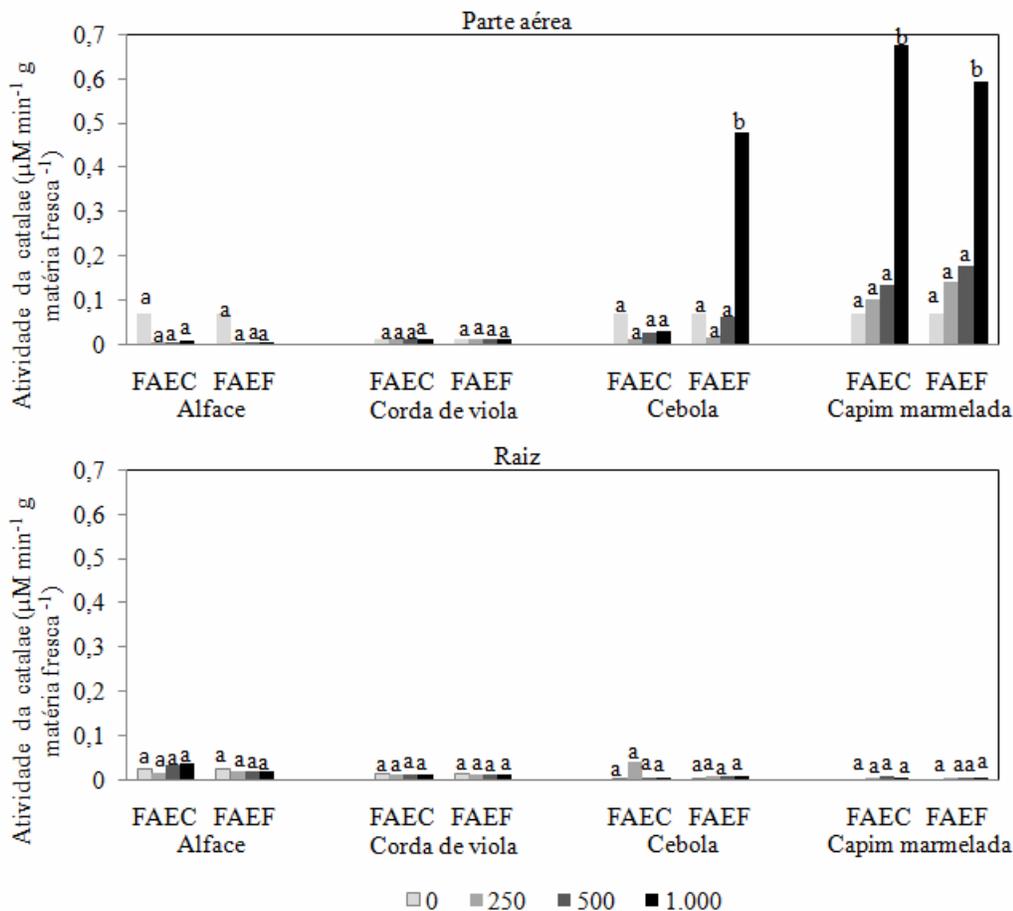


FIGURA 22. Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila do caule (FAEC) e folhas (FAEF) de *C. doctoris* sobre a atividade da catalase da parte aérea (A) e raiz (B) de alface, corda de viola, cebola e capim marmelada. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Nas plantas, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidos em decorrência a diversas perturbações ambientais, como por exemplo, excesso de luz, seca, temperaturas elevadas, herbicidas e, até mesmo, substâncias químicas naturais como aleloquímicos (YU et al., 2003).

DISCUSSÃO

Na composição química do óleo de *Croton doctoris* aqui estudado, encontrou-se grande diferença em relação às demais espécies de *Croton* citadas na literatura no que se refere à composição química. Foi evidenciada a ausência de monoterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais, sendo a composição formada exclusivamente por sesquiterpenos oxigenados e não-oxigenados, tanto nos óleos da folha como no caule de *C. doctoris*.

Radulovic et al. (2006) encontraram nas espécies de *Croton antanosiensis* (folhas), *C. decaryi* (folhas e caule), *C. geayi* (folhas) e *C. sakamaliensis* (folhas e caules) mais de 20 compostos nos óleos essenciais das mesmas, sendo a maioria monoterpenos (α e β -pinenos, 1-8-cineol, borneol, α -terpineol) e sesquiterpenos não oxigenados (cariofileno e α -humuleno). Pino et al. (2006) analisaram os óleos das folhas de *C. rosmarinoides*, *C. litoralis*, *C. spiralis* e *C. myricifolius* e identificaram a presença de α -bisabolol (16,6%), 1,8-cineol (20,9%), espatulenol (13,8%), α -terpineol (11,6%), borneol (8,8%), óxido de cariofileno (8,8%) e acetato de bornila (7,7%) como os maiores constituintes do óleo essencial destas espécies de *Croton*.

Algumas espécies do gênero *Croton* do Nordeste Brasileiro foram estudadas quanto a suas composições químicas e atividade antioxidante dos óleos essenciais (DE MORAIS et al., 2006). Observou-se que as espécies apresentaram significativos teores de monoterpenóides com destaque para os terpenos α -pineno e α -copaeno, e variação na composição de sesquiterpenos oxigenados e não-oxigenados. Além destes compostos, foram encontrados também fenilpropanóides (*E*-anetol, metil-eugenol). Fenilpropanóides, também foram encontrados e identificados no óleo de *C. urucurana* (SIMIONATTO et al., 2007).

Nos resultados de fitotoxicidade com o óleo essencial do caule e folhas de *C. doctoris* verificou-se o maior efeito fitotóxico no óleo do caule, esse resultado pode ser, em parte, associado ao seu constituinte majoritário, o óxido de cariofileno (24,5%) e o teor de sesquiterpenos oxigenados (61,1%), que são superiores no óleo do caule. No óleo da folha o teor de sesquiterpenos oxigenados é menor (17,1%), sendo este óleo rico em sesquiterpenos hidrocarbonetos (64,0%), apresentando menor efeito fitotóxico que o óleo do caule.

Vários são os relatos na literatura sobre a atividade fitotóxica de óleos essenciais e monoterpenóides e seus possíveis usos como bioherbicidas (BATISH et al., 2004; SABAN KORDALI et al., 2009). Um estudo realizado por Vokou et al (2003) mostrou

o efeito de monoterpenóides, ensaiados em misturas e na forma pura, observando-se que os compostos oxigenados são mais ativos que os não oxigenados. Entre os monoterpenóides merecem destaque quanto as suas atividades herbicidas o 1-8-cineol, cânfora, borneol, citrionelol e os monoterpenos aromáticos carvacrol e timol (SINGH et al., 2002; KORDALI et al., 2008). Nota-se que os óleos ricos em sesquiterpenos, como é o caso dos óleos de *C. doctoris*, ainda são pouco relatados ou ensaiados quanto às atividades alelopáticas (bioherbicidas), sendo que a grande maioria dos estudos envolve monoterpenos ou o óleo bruto.

Nos resultados com o extrato bruto e as frações semipurificadas do caule e folhas de *C. doctoris* em laboratório e casa de vegetação observou-se os maiores efeitos fitotóxicos na fração acetato de etila. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que os óleos essenciais e a fração acetato de etila do caule de *C. doctoris* têm ação inibitória sobre a germinação, crescimento e metabolismo das plantas-alvo, interferindo na captação de energia luminosa, por diminuir o teor de clorofila, e na liberação dessa energia, armazenada em moléculas orgânicas, para o crescimento, multiplicação e manutenção das células, por interferir na respiração celular. Verificou-se também aumento da atividade de enzimas antioxidantes o que indica indução do metabolismo de defesa em resposta aos compostos do óleo e frações do caule, além da inibição da divisão celular. Todos esses processos metabólicos são cruciais para o estabelecimento de qualquer planta.

Poucos trabalhos têm se referido aos efeitos alelopáticos em casa de vegetação e campo, onde os efeitos são menos pronunciado, devido muitos aleloquímicos, após a aplicação serem biodegradados ou adsorvidos pelas partículas do solo ou ainda não serem translocados pelas plantas-alvo até o sitio de ação. Desta forma estudos do potencial herbicidas de extratos ou compostos isolados de plantas devem ser realizados em casa de vegetação para se verificar o efeito inibitório nessas condições.

Cândido et al. (2010) verificaram que o extrato bruto e frações semipurificadas da parte aérea de *Senna occidentalis* apresentaram efeito fitotóxico na emergência e crescimento de alface, tomate, cebola e trigo em casa de vegetação. Em trabalho realizado com o óleo essencial de *Croton urucurana* verificou-se efeito herbicida na germinação e crescimento de alface e cebola, sendo observado inibição no crescimento de alface e cebola em 100%, em comparação ao controle, quando submetidas ao óleo essencial do caule de *C. urucurana* (SIMIONATTO et al., 2009).

Nos resultados verificou-se que o óleo essencial e a fração acetato de etila (FAE) do caule e folhas de *C. doctoris* reduziram o teor de clorofila das plântulas alvo em laboratório. Nos bioensaios em casa de vegetação verificou-se que a FAE do caule e folhas além de reduzir o teor de clorofila provocou reduções na taxa fotossintética.

A fotossíntese pode ser inibida de diversas formas, sendo a mais freqüente, a diminuição do fluxo de CO₂ para os sítios de carboxilação decorrentes do fechamento dos estômatos. Um segundo fator se relaciona com o transporte de elétrons na membrana dos tilacóides durante a formação do poder redutor. Um último fator, está relacionado com o transporte e com o aproveitamento dos fotoassimilados que poderiam inibir a fotossíntese por acúmulo de produto final (TAIZ e ZEIGER, 2002). O experimento realizado aborda os efeitos do óleo essencial e da fração acetato de etila do caule e folhas de *C. doctoris* sobre as reações fotoquímicas medidas pela taxa de fotossíntese e o teor de pigmentos. Diante dos resultados obtidos, é possível verificar que, os aleloquímicos presentes em *C. doctoris* podem estar atuando no processo fotossintético causando degradação ou inibição da síntese das moléculas de clorofila. A aparência clorótica das plantas, observado no presente trabalho, seria um sintoma de degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLING, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolidonas (DUKE, 1985; CAYON et al., 1990).

Nos estudos com aleloquímicos, a degradação da clorofila tem sido relacionada como um dos sintomas da interferência destas substâncias sobre as plantas (SINGH et al., 2002). Contudo, ainda não está claro o mecanismo pelo qual ocorre à redução da clorofila quando tratadas com aleloquímicos, podendo haver dois fatores para essa causa, degradação ou inibição da síntese de clorofila (YU et al., 2003).

Sorgoleone, aleloquímico produzido pelo sorgo (*Sorghum bicolor*), é um potente inibidor do transporte de elétrons do fotossistema II (PSII) em cloroplastos isolados (GONZALEZ et al., 1997). Estudos mais detalhados dos mecanismos de ação de aleloquímicos comprovam que a H⁺-ATPase da membrana dos tilacóides e a cadeia de transporte de elétrons do PSII foram inibidos pelo xantorrizol, aleloquímico extraído de *Iostephane heterophylla* (GONZALEZ-BERNARDO et al., 2003). Alguns aleloquímicos como lactonas, terpenos, cumarinas, flavonóides, fenilpropanóides e benzofuranos atuam como inibidores fotossintéticos e, compostos como benzopiranos,

lactonas, terpenos e fenilpropanídes atuam como inibidores da reação de Hill (KING-DIAZ et al., 2001). É possível que, aleloquímicos presentes em *C. doctoris* podem estar atuando no processo fotossintético através de mecanismo de ação semelhante aos aleloquímicos já estudados.

Compostos alelopáticos de *Dactylis glomerata* L. atuam na fotossíntese de outras plantas, com ação similar aos herbicidas fluometuron e linuron (REIGOSA et al., 1999), enquanto os ácidos fenólicos, as cumarinas, os polifenóis e os flavonóides são apontados como aleloquímicos que atuam como herbicidas inibidores da fotossíntese, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas (DURIGAN e ALMEIDA, 1993).

Yu et al. (2003) estudaram efeitos de extrato aquoso de exsudatos radiculares de pepino (*Cucumis sativus*), ou derivados dos ácidos benzóico e cinâmico na fotossíntese e atividade enzimática de mudas de pepino cultivadas em solução nutritiva. Nos resultados foi observado que os extratos reduziram a taxa de fotossíntese quando aplicadas em concentrações mais elevadas, porém ao contrário desse trabalho reduziram também a transpiração e a condutância estomática.

A respiração celular também pode ser fortemente afetada pela presença de aleloquímicos (RICE, 1984; OHNO, 2000) que interferem em várias etapas desse processo em um ou mais níveis, dos quais dependem as respostas observadas (CHON et al., 2000). A juglona, uma naftoquinona isolada das folhas, da casca dos frutos secos e da casca do tronco de indivíduos do gênero *Juglans* (Juglandaceae), pode reduzir em até 90% a respiração das raízes de milho, enquanto o macerado de folhas de artemisia (*Artemisia tridentata* Nutt.) acelera a respiração das células radiculares de pepino, devido a presença de substâncias do grupo das lactonas (DURINGAN e ALMEIDA 1993). Portanto, a respiração das células radiculares pode ser aumentada ou diminuída, dependendo da natureza química dos compostos presentes nos vegetais empregados.

O aumento da atividade da peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) das espécies avaliadas, no presente trabalho, sugere que os aleloquímicos presentes no óleo essencial e na fração acetato de etila do caule e folhas de *C. doctoris* estão causando estresse oxidativo nas espécies avaliadas. Nas plantas, espécies reativa de oxigênio são produzidas em decorrência de diversas perturbações ambientais, como por exemplo, excesso de luz, seca, temperaturas elevadas, herbicidas, e, até mesmo, substâncias químicas naturais como os aleloquímicos (YU et al., 2003).

Sabe-se que alguns aleloquímicos induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo como conseqüência final a modificação da permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular (FERRARESE et al., 2000). Aleloquímicos, como benzopiranos, terpenos e fenilcumarinas apresentam a mesma capacidade oxidativa do herbicida paraquat, que age recebendo elétrons do receptor primário do fotossistema I (PSI) para formar radicais superóxido (ALSCHER et al., 2002).

O aumento na atividade da CAT já foi observado em outros estudos sobre modos de ação de aleloquímicos, onde foi verificado que o ácido ferulico aumentou a atividade da CAT em plântulas de milho (DEVI e PRASAD, 1996), e ácido benzóico em cotilédones de pepino (MAFFEI et al., 1999).

A enzima SOD catalisa os radicais superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais da célula, para oxigênio molecular e H_2O_2 (RABINOWITCH e FRIDOVICH, 1983). Dessa forma, parece que substâncias presentes no óleo e fração acetato de etila do caule estariam induzindo a formação de radicais livres nas plântulas e conseqüentemente ativando a enzima superóxido dismutase.

Os aleloquímicos estimulam a produção de oxigênio reativo por diversos mecanismos. Dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O_2 formando superóxido. A sorgolena, uma substância presente no sorgo (*Sorghum bicolor*) é capaz de inibir a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II (PSII) para fotossistema I (PSI) (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005), além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares. Os aleloquímicos também podem formar radicais semioquímicos, um composto derivado das quinonas, o qual é altamente reativo e doa elétrons para o O_2 , formando o superóxido (WEIR et al., 2004). Um outro mecanismo conhecido na formação de EROs é a atividade dos aleloquímicos sobre a NADPH oxidase, uma enzima que transfere elétrons do NADPH e doa para um aceptor (O_2) formando o superóxido (FOREMAN et al., 2003).

O aumento de radicais livres em células de plantas em respostas aos aleloquímicos mostra-se de forma similar à infecção por patógenos, bem como outros fatores abióticos que resultam no estresse oxidativo (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005). Nesse sentido, (-)-catequina, um aleloquímico dos exudatos das raízes de *Centaurea maculosa*, tem sido relatado como inibidor do crescimento de *Festuca*

idahoensis, *Koeleria micrantha* e *Arabidopsis thaliana* pelo aumento da produção de EROs (BAIS et al., 2003). Um aumento substancial de espécies reativas de oxigênio (ERO) provocado por (-)-catequina nas raízes de plantas suscetíveis foi similar aos padrões da morte induzida de células, no entanto, com a adição de ácido ascórbico junto com (-)-catequina observou-se bloqueio da produção de EROs, suportando a hipótese de que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e oxidantes é provavelmente um efeito secundário de muitos aleloquímicos. Assim, as plantas aumentam a atividade dessas enzimas na tentativa de contra atacar os efeitos prejudiciais da geração de EROs.

Provavelmente o aumento das EROs, no presente trabalho, ocorreu devido a redução nos teores de clorofila e da respiração o que levou conseqüentemente ao bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O₂ formando radicais livres e assim ocorre aumento da atividade de enzimas antioxidantes para reduzir os efeitos prejudiciais dos radicais livres.

A interferência na divisão celular causada pela ação do óleo e fração acetato de etila com acentuado efeito sobre a morfologia do sistema radicular provavelmente representa um dos mecanismos de ação das substâncias (s) com atividade fitotóxica. A redução do crescimento de plantas na presença de aleloquímicos é associada com uma forte inibição da mitose ou/e rompimento da estrutura das organelas, como por exemplo, núcleo e mitocôndrias (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005).

A análise do índice mitótico é um método eficiente utilizado para avaliar o efeito alelopático de uma planta sobre outra. A observação em microscópio torna-se imprescindível para a detecção de anomalias nas fases da mitose, bem como de formas atípicas das estruturas celulares (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005). O uso do extrato aquoso das folhas da leucena (*Leucaena leucocephala*) tem apresentado efeito alelopático sobre várias plantas, tais como alface, arroz, milho e nas plantas daninhas desmódio (*Desmodium discendens*), guanxuma (*Sida rhombifolia*) e assapeixe (*Vernonia polyanthes*), inibindo a germinação e afetando o crescimento do sistema radicular das plantas (SOUZA FILHO et al., 1997). Pires et al. (2001) observaram que o extrato aquoso de leucena pode reduzir o índice mitótico em plantas de milho, bloqueando completamente a fase de telófase em maiores concentrações, fato também observado nos resultados do presente trabalho.

Estudos recentes têm demonstrado que os aleloquímicos produzidos por *Secale cereale* L. reduzem o crescimento radicular de *Cucumis sativus* L. causando mudanças nas estruturas celulares das raízes (BURGOS et al., 2004). Solo tratado com ácido

benzóico em maiores concentrações suprimiu em até 81,1% o crescimento do sistema radicular de mostarda, fato que foi atribuído a desorganização e destruição das organelas celulares e dissolução da lamela média (KAUR et al., 2005). Desse modo, sugere-se que os distúrbios nas membranas celulares podem ser consequência da peroxidação das membranas de lipídeos ou proteínas (SONG et al., 1996), resultando em mudanças na permeabilidade das membranas, destruição dos cloroplastos, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático. Esses processos fisiológicos anormais resultam na redução da fotossíntese, contribuindo para a redução do crescimento das plantas.

CONCLUSÕES

O óleo essencial do caule apresenta ação inibitória sobre a germinação, crescimento e metabolismo de alface e cebola, mostrando que a mistura de sesquiterpenos oxigenados tem potencial fitotóxico.

A fração acetato de etila do caule de *Croton doctoris* apresenta atividade alelopática (fitotóxica) em laboratório, provocando reduções na germinação, crescimento e metabolismo das plantas-alvo.

A fração acetato de etila do caule e folhas de *Croton doctoris* apresentou maior atividade fitotóxica em casa de vegetação, provocando maior inibição do crescimento e reduções na taxa fotossintética, teores de clorofila, e respiração das raízes além de induzirem estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois Allured - USA: Publishing, 1995.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microgarnismos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574p.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**. v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

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

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

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

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

APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**. v. 90, p. 109-116, 1989.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

ARAUJO-JUNIOR, V.T.; SILVA, M.S.S.; CUNHA, E.V.L.D. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 553-557, 2005.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiol**. v. 141, p. 391-396, 2006.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wildtype and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**. v. 104, p. 280-292, 1998.

BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; KENNAN, A.J.; STERMITZ, F.R.; VIVANCO, J.M. Structure-dependant phytotoxicity of catechins and other flavonoids: flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **J. Agric. Food Chem**, v. 51, n. 4, p. 897-901, 2003.

BARBOSA, L.C.A., MALTHA, C.R.A., BORGES, E.E.L. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de lactonas derivadas de 2,4-dimetil-8-oxabicyclo [3.2.1]- oct-6-em-3-ona. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 203-208, 2002.

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

- BATISH, D.R.; SETIA, N.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Prot.**, n. 23, p. 1209-1214, 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-286, 1971.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 2009.
- BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**. v.161, p. 405-414, 2001.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). **J. Chem. Ecol.**, v. 30, n. 3, p. 671-689, 2004.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.43, p. 83-116, 1992.
- BOWLWER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 13, n. 3, p. 199-218, 1994.
- CASTAÑEDA, P.; MATA, R.; LOTINA-HENNSSEN, B.; ANAYA, A.L.; BYE, R. Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. **Journal Natural Products**, v. 9, p. 232-326, 1996.
- CAYON, D.G.; LOPES, N.L.; OLIVA, M.A.; SILVA, J.F. Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 2, p. 33-40, 1990.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1222-1227, 1992.
- CÂNDIDO, A.C.S.; SCHMIDT, V.S.; LAURA, V.A.; FACCENDA, O.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.C.; PERES, M.T.L.P. Allelopathic potential of *Senna occidentalis* (L.) Link. **Allelopathy Journal**, v. 2, p. 35-44, 2010.
- CHAQUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v. 127, p. 139-147, 1997.
- CHON, S.U.; COUTTS, J.H.; NELSON, C.J. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 715-720, 2000.
- CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S.; JANG, H.G.; PYO, B.S.; KIM, S.M. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. **Crop Protection**, v. 21, p. 1077-1082, 2002.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 8, p. 609-636, 1999.

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

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n.9, p. 2079-2093, 2000.

DE MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; DA SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do brasileiro. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. **Biologia Plantarum**, v. 38, p. 387-395, 1996.

DUKE, S.O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. Pp. 91-112. In: S.O. DUKE (ed.) *Weed Physiology*. Vol. II. Boca Raton, CRC Press, 1985.

DUKE, S.O.; ABBAS, H.K. Natural products with potential use as herbicides. In: NARWAL, S.S.; TAURO, P. **Allelopathy in pest management for sustainable agriculture**. India: Scientific publisher. Jodhpur, 1996.

DUKE, S.O., RIMANDO, A.M., DAYAN, F.E., CANEL, C., WEDGE, D.E., TELLEZ, M.R., SCHRADER, K.K., WESTON, L.A., SMILLIE, T.J., PAUL, R.N., DUKE, M.V. Strategies for the discovery of bioactive phytochemicals. In: BIDLACK, W.R., OMAYE, S.T., MESKIN, M.S., TOPHAM, D.K.W. **Phytochemicals as Bioactive Agents**. Technomic Publishing Company. Lancaster, Pennsylvania. p.1-20, 2000a.

DUKE, S.O., ROMAGNI, J.G., DAYAN, F.E. Natural product as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, p. 583-589, 2000b.

DUKE, S.O., SCHEFFLER, B.E., DAYAN, F.E. Allelochemicals as herbicides. **First European Allelopathy Symposium**. Vigo, Spain. p. 47-59, 2001.

DUKE, S.O., RIMANDO, A.M., BAERSON, S.R., SCHEFFLER, B.E., OTA, E. Strategies for the use of Natural Products for Weed Management. **Journal of Pesticide Science**, v. 27, p. 298-306, 2002.

DURINGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre alelopatia**. Jaboticabal, FUNEP, 28p. 1993.

EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The Science of Alleloathy**. New York: John Wiley and Sons, Inc., p. 171-188, 1986.

EINHELLIG, F.A. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo: Universidade de Vigo. p. 1-23, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro nacional de pesquisa de solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: 2006. 169p.

FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE FILHO. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 22, p. 121-124, 2000.

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

FIASCHI, P.; PIRANI, J.R. Flora da Serra do Cipó. **Boletim Botânico Universitário**, v. 23, n. 2, p. 78-81, 2005.

FOREMAN, J.V.; DEMIDCHIK, J.H.F.; BOTHWELL, P.; MYLONA, H.; MIEDEMA, M.A.; TORRES, P.; LINSTEAD, S.; COSTA, C.; BROWNLEE, J.D.G.; JONES, J.M.; DAVIES DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 442-445, 2003.

FOYER, C.H.; LELANDAIA, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**. v. 92, p. 696-717, 1994.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 58, p. 61-76, 1986.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto, v. 27, p. 97-112, 1995.

FRUGOLI, J.A.; ZONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCHUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, v. 198, p. 139-143, 1996.

GNIASZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology. Plant.**, n. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

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

GONZALES, V.M.; KAZIMIR, J.; NIMBAL, C.I.; WESTON, L.A. CHEINAE, G.M. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural Food Chemical**, n.45, p.1415-1455, 1997.

- HENWOOD, M.J.; HART, J.M. Towards an understanding of the phylogenetic relationships of australian *hydrocotyloideae* (*apiaceae*). **Journal of Botany**, v. 58, n. 2, p. 269-289, 2001.
- HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol.** v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.
- HOLTMAN, W.L.; HEISTEK, J.C.; MATTERN, K.A.; BAKHIIZEN, R.; DOUMA, A.C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science.** v. 99, p. 43-53, 1994.
- INDERJIT; DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.
- INDERJIT, D.K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, p. 28-44, 1995.
- KAUR, H.B.; INDERJIT, KAUSHIK, S. Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. **Plant Physiol. Biochem.**, n. 43, p. 1, p. 77-81, 2005.
- KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNÁNDEZ-TERRONES, M.; LOTINA-HENNSSEN, B. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. In: BERNAL-LUGO, I.; LOZA-TAVERA, H. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**. Ciudad de México, p. 111-132, 2001.
- KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 8788-8795, 2008.
- LEATHER, G.R. & EINHELLIG, F.A. Bioassays in the study of allelopathy. IN: PUTNAN, A.R. & TANG, C.S. **The Science of Allelopathy**. John Wiley and sons, New York, NY, p. 133-145. 1986.
- LÉON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**. v. 108, n. 4, p. 1673-1678, 1995.
- LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R.M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, p. 813-820, 2002.
- MACIAS, F.A. Allelopathy in search for natural herbicide models. In: NARWAL, S.S.; TAURO, P. **Allelopathy in Pest Management for Sustainable Agriculture**. Scientific publisher. Jodhpur, India, p. 310-329, 1996.
- MACIAS, F.A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000a.

MACIAS, F.A., GALLINDO, J.C.G., MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: Application of allelopathic studies. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**, Ed Teus J.C. Luijendijk, Phytoconsult, p. 137-161, 2000b.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D.; VELSACO, R.F. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicides models. 2. Guaianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000c.

MACIAS, A.F.; FERNANDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; ALVES, P.L.C.A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795-800, 2006.

MAFFEI, M.; BERTEA, C.M.; GARNERI, F.; SCANNERINI, S. Effect of benzoic acid hydroxy and methoxy ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I. Isocitrate lyase and catalase activity. **Plant Science**, v. 141, p. 139-147, 1999.

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia – importância e suas aplicações. **Horti Sul**. v.1, n. 3, p. 27-32, 1990.

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

MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88. n. 6. p. 854-859, 1996.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 562-592, 2001.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **J. Exp. Bot.**, v. 54, p. 1931-1939, 2003.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 49, p. 249-278, 1998.

OHNO, T. Phytotoxic effects of red clover amended soils on wild mustard seedling growth. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 78, p. 187-92, 2000.

PALMEIRA-JUNIOR, S.F.; CONSERVA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, 1420-1424, 2005.

PANCHUK, I.I.; VOLKOV, R.A.; SCHOFFL, F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. **Plant Physiol.** v. 129, p. 838-353, 2002.

PERES, M.T.L.P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical Composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 56, 223-226, 1997.

PINO, J.A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; HERRERA, P.; MARTI, M.P. Volatile leaf oils from Cuban Euphorbiaceae: *Croton rosmarinoides* Millsp., *Croton litoralis* Urb., *Croton spiralise* Muell. Arg. and *Croton myricifolius* Griseb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 3, p. 256-260, 2006.

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

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

PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOUZA, T. W. **Plantas daninhas de pastagem da região dos Cerrados**. 2007.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, I.N.M.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesq Agrop. Brás.**, v. 35, p. 909-914, 2000.

PUTNAM, A.R. **Weed Allelopathy**, p.131-155, 1985.

PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. Allelopathy state of the science. In: PUTNAM, A.R. & TANG, C.S. The science of allelopathy. John Wiley & Sons: New york. p. 1-19. 1986.

RABINOWITCH, H.D.; FRIDOVICH, I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. **Photochem. Photobiol.**, v. 37, p. 679-690, 1983.

RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 8, p. 648-653, 2006.

RAIJ, B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba, SP: Agronômica Ceres, 1991. 343p.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRA, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, p. 577-608, 1999.

REZENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

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

RICE, E.L. **Allelopathy**. Second Edition. London: Academic Press Inc, 1984.

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

RODRIGUES, L.R.A., RODRIGUES, T.J.D., REIS, R.A. **Alelopatia em Plantas Forrageiras**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

SABAN KORDALI, S.; CAKIR, A.; AKCIN, T.A.; EBRU METE, E.; AKCIN, A.; AYDIN, T.; KILIC, H. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and *n*-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). **Ind. Crops Prod.**, n. 29, p. 562-570, 2009.

SAITO, M.L.; LUCHINI, S. **Substâncias Obtidas de Plantas e Praguicidas Eficientes e Seguros ao Meio Ambiente**. EMBRAPA – CNPMA, 46p, 1998.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 4º edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 333-364, 2002.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; POPPI, N.R.; JUNIOR, J.L.R.; STUKER, C.Z.; PERUZZO, G.M.; PERES, M.T.L.P.; HESS, S.C. Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidase – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against the bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Prot.**, v. 21, p. 347-350, 2002.

SONG, F.M.; ZHENG, Z.; CHUN, G.X. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plant-pathogen interactions. **Plant Physiol. Commun.** v. 32, n. 5, p. 377-385, 1996.

SOUZA FILHO, A.P.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 32, n. 2, p. 165-170, 1997.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Mecanismo de liberação e comportamento de aleloquímicos no ambiente. In: SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. **Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais**. Belém: EMBRAPA, p.111-154. 2002.

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

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1423-1426, 1967.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.449-484.

TEXEIRA, C.M., ARAUJO, J.B.S., CARVALHO, G.J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de Picão-Preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 691-695, 2004.

VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**. v. 57, p. 701-710, 2001.

VOKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G.J.; HALLEY, J.M. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on Seed Germination and Subsequent Seedling Growth. **J. Chem. Ecol.** v. 29, p. 2281-2301, 2003.

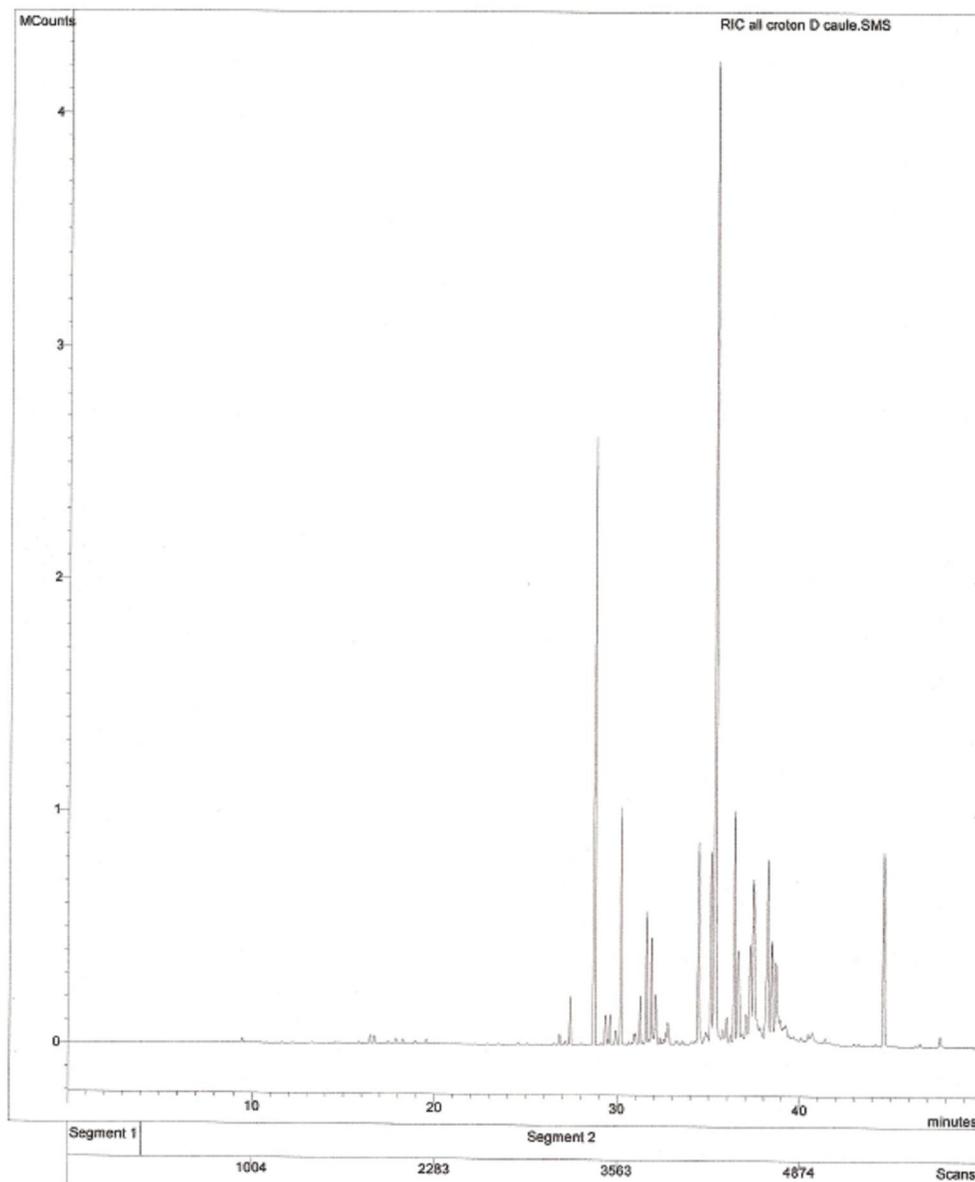
YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiol.** v. 123, p. 223-233, 2000.

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

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 7, n. 4, p.472-479, 2004.

ZENG, R.S.; LUO, S.M.; SHI, Y.H.; SHI, M.S.; TU, C.Y. Physiological and Biochemical Mechanism of Allelopathy of Secalonic Acid F on Higher Plants. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 72-79, 2001.

ANEXOS

FIGURA 23. Cromatograma do óleo essencial do caule de *Croton doctoris*.

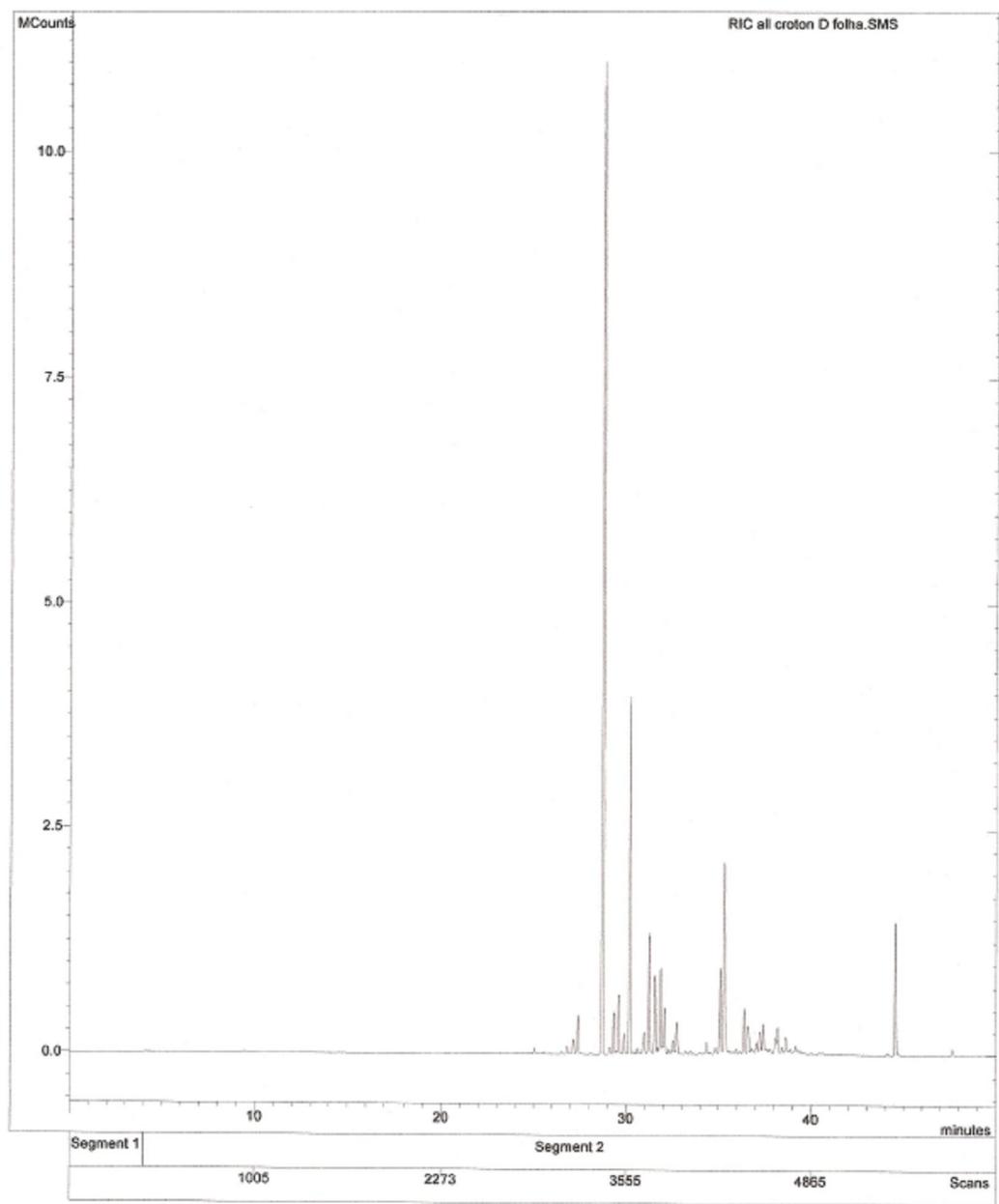


FIGURA 24. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton doctoris*.