Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos

**DETERMINAÇÃO DE ALELOQUÍMICOS POR HPLC/UV-Vis EM
EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTES DE *Canavalia ensiformis* E
ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de
mestre em Ciências – Química Analítica.*

Raquel Lourenço Mendonça

Orientadora: Maria Olímpia de Oliveira Rezende

2008

Depois de algum tempo você aprende a diferença... a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.

E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas.

E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...

E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde indo, qualquer caminho serve.

Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chate quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.

William Shakespeare

Agradecimentos

Em especial,

A DEUS pelo seu amor incondicional.

Aos meus pais Francisco e Luzinete Mendonça pelo apoio, compreensão a minha ausência e amor incomparável que me dedicam.

A minhas irmãs maravilhosas que sempre me apoiaram, deram e dão força para eu continuar essa caminhada. É o que nos une vai muito além de laços de sangue.

*A minha sobrinha Giovanna que me proporciona grandes alegrias.
Amo-te muito lindinha.*

- A professora Dr. Maria Olímpia, que prontamente me aceitou no grupo de Química Ambiental e pela orientação.

- Aos meus eternos amigos Eliane e Joel, pelos momentos memoráveis.

- A Keila minha amiga querida que suportou as madrugadas frias me fazendo companhia no laboratório mostrando-me o significado real de uma amizade, me erguendo quando eu achava que já não conseguiria mais.

- A Diva por sua amizade, pelos sábios conselhos.

- Aos meus grandes amigos com os quais aqui cheguei Estela, Roberta, Luciano e Roberto, dedico todo carinho.

- Aos novas e velhas amigas do LQA Elke, Joel, Paula, Paulo, Fabiane, Diva, Flávia, Clever, Thomas, Jussara, Tália, Mauricio, Isekiel que um dia comigo aqui estiveram.

- Aos meus grandes amigos, Elke, Joel, Paula, Marcelo, com os quais vivemos e continuaremos vivendo grandes emoções.

- A minha grande amiga Goretti pelos seus conselhos e ensinamentos que levarei pra sempre. É minha amiga! Todos os lugares em que eu estiver um pouquinho de ti estará comigo.

- A minha amiga Thais Lazarini por sua amizade. Agradeço por sempre estar disposta a me ouvir. E ouvia tanto choro... De saudade, alegria... Obrigada amiga. Ah! Obrigada por compartilhar o amor do pequeno Rennan comigo. Amo vocês.

- A você João Paulo, que fez parte de minha vida neste último ano. Dedico aqui meu carinho.

- A Fran pelo incentivo para que eu estivesse aqui hoje. Obrigada amiga.

- As minhas amigas Juliana e Viviane, que sempre acreditaram em mim e mesmo percorrendo caminhos diferentes, depois de tantos anos nossa amizade só aumenta. Vivi; Ju... Não esqueço dos fins de semana e feriados dedicados aos estudos e daqueles relatórios intermináveis do professor Hiroka e vocês dizendo. Ra! Não vemos você fazendo outra coisa. Você tem que continuar. E eu insistindo pra vocês continuarem seguindo comigo.

- A Sílvia e Andréia da secretaria de pós-graduação por sempre me receberem com carinho.

- A Cidinha e a Renatinha do laboratório de ensino por prontamente me socorrerem quando eu precisava de algum material.

- A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

- A todos aqueles que passaram por minha vida deixando um pouquinho de si e levando um pouquinho de mim, fica aqui expressa toda minha gratidão.

SUMÁRIO

<i>Índice de Figuras.....</i>	<i>i</i>
<i>Índice de Tabelas.....</i>	<i>iv</i>
<i>Resumo.....</i>	<i>v</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>vii</i>
<i>Símbolos e Abreviações.....</i>	<i>viii</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1 – Agroquímico.....	2
1.2 - Agricultura e Meio Ambiente.....	4
1.3 - Plantas Daninhas.....	6
1.4 – Alelopatia.....	9
1.4.1 - Alelopatia na Germinação.....	15
1.5 - <i>Canavalia ensiformis</i> (feijão-de-porco).....	16
1.6 - Compostos Fenólicos.....	18
1.7 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	23
2 – OBJETIVOS.....	30
3. EXPERIMENTAL.....	32

3.1 - Materiais.....	32
3.1.1 – Padrões.....	32
3.1.2 – Solventes.....	32
3.1.3 – Equipamentos.....	33
3.1.4 - Outros materiais.....	33
3.2 - Estudos do Potencial Alelopático do Extrato Aquoso de Sementes de Canavalia Ensiformis (Feijão-de-Porco).....	34
3.2.1 – Coleta.....	34
3.2.2 - Obtenção dos Extratos Aquosos Brutos.....	35
3.2.3 - Avaliação do Potencial Alelopático.....	36
3.3 – Análises por HPLC de Compostos Fenólicos em Extrato Aquoso de Sementes de Feijão-de-Porco (<i>Canavalia ensiformis</i>).....	39
3.3.1 - Fracionamento Cromatográfico Dos Extratos Aquosos.....	39
3.3.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	41
3.3.3 – Determinação dos Limites de Detecção (LOD) e de Limite de Quantificação (LOQ).....	44
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 - Avaliações do Potencial Alelopático de Extratos Aquosos de sementes de Canavalia ensiformis (<i>Feijão-de-porco</i>).....	47
4.1.2 – Estudo do efeito fitotóxico de extrato de Canavalia ensiformis após fracionamento.....	58

4.2 – Análises Cromatográficas por HPLC–UV-VIS.....	60
4.2.1 - <i>Análises de Compostos Fenólicos presentes em sementes de Canavalia ensiformis por HPLC.....</i>	<i>60</i>
4.2.2 – <i>Análise quantitativa de compostos fenólicos por HPLC-UV/Vis.....</i>	<i>66</i>
4.3 – Potencial Alelopático dos Compostos Determinados Sobre a Germinação de Plantas Daninhas.....	68
5 – CONCLUSÕES.....	73
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 – Rota de de formação de metabólitos secundários nas plantas (fonte: http://www.geocities.com/~esabio/interacao/metabolitos.htm).....	11
Figura 02 - <i>Canavalia ensiformis</i> (feijão-de-porco) (a - planta, b-sementes).....	17
Figura 03 - Estrutura dos compostos fenólicos estudados.....	22
Figura 04 - Esquema de um sistema de cromatografia de alta eficiência (HPLC).....	24
Figura 05 - Esquema do Fracionamento Cromatográfico em sílica gel (MELECCHI, 2005, com modificações).....	39
Figura 06 - Comprimentos de onda para absorção de luz UV/Vis para os analitos em estudo.....	41
Figura 07 - Cromatograma dos padrões de compostos fenólicos comprimentos de onda 255, 270 e 330 nm: 1- ácido clorogênico, 2 – ácido ferúlico, 3 – rutina, 4 – naringina, 5 – ácido p-anisíco, 6 – quercetina, 7 – genisteína, 8 – kaempferol.....	43
Figura 08 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a germinação de sementes de trapoeraba (substrato solo).....	48
Figura 09 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a germinação de sementes de trapoeraba (substrato papel).....	48
Figura 10 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a germinação de sementes de corda-de-viola (substrato papel).....	49
Figura 11 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a velocidade de germinação de sementes de corda-de-viola (substrato solo).....	49

Figura 12 - Efeito fitotóxico do extrato de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i> no desenvolvimento de sementes de trapoeraba e corda-de-viola (substrato solo e papel).....	50
Figura 13 - Biomassa das plântulas de trapoeraba e corda-de-viola no ensaio alelopático com sementes de <i>Canavalia ensiformis</i> (substrato solo e papel).....	52
Figura 14 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre o crescimento radicular de sementes de corda-de-viola e trapoeraba usando como substrato papel de filtro e solo.....	52
Figura 15 - Comparação do crescimento radicular de plântulas corda-de-viola utilizando extratos nas concentrações 0 e 10 g L ⁻¹ (substrato papel).....	53
Figura 16 - Comparação do crescimento radicular de plântulas corda-de-viola utilizando extratos nas concentrações 0 e 10 g L ⁻¹ (substrato solo).....	53
Figura 17 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a velocidade de germinação de sementes de soja (substrato papel).....	56
Figura 18 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre a velocidade de germinação de sementes de soja (substrato solo).....	56
Figura 19 - Efeito fitotóxico de extratos de <i>Canavalia ensiformis</i> sobre o crescimento radicular de sementes de soja usando como substrato papel de filtro e solo.....	57
Figura 20 - Efeito fitotóxico da fração polar (fração 4 e 5) no desenvolvimento de sementes de corda-de-viola e trapoeraba (substrato papel).....	59
Figura 21 - Efeito fitotóxico da fração polar (fração 4 e 5) no desenvolvimento de sementes de trapoeraba (substrato papel).....	60
Figura 22 - Frações obtidas através do fracionamento com hexano, hexano:benzeno (1:1), diclorometano, acetato de etíla e metanol.....	61

- Figura 23** - Cromatograma a 255, 270 e 330 para a fração diclorometano de extrato de sementes de feijão-de-porco.....62
- Figura 24** - Cromatograma obtido a 255 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L⁻¹: 1 - ácido clorogênico, 2 – ácido ferúlico, 3 – rutina, 4 – naringina, 5 – Ácido p-anísico, 6 – quercetina, 7 – genisteína, 8 – Caempferol.....63
- Figura 25** - Cromatograma obtido a 270 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L⁻¹: 1 - ácido clorogênico, 2 – ácido ferúlico, 3 – rutina, 4 – naringina, 5 – ácido p-anísico, 6 – quercetina, 7 – genisteína, 8 – Caempferol.....64
- Figura 26** - Cromatograma obtido a 330 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L⁻¹: 1 - ácido clorogênico, 2 – ácido ferúlico, 3 – rutina, 4 – naringina, 5 – ácido p-anísico, 6 – quercetina, 7 – genisteína, 8 – Caempferol.....65
- Figura 27** - Curvas analíticas dos compostos fenólicos determinados nos comprimentos de onda (λ) 255 e 330 nm (A – ácido clorogênico e B – ácido ferúlico a 330 nm; C – p-anísico e D – genisteína a 255 nm).....67
- Figura 28** - Efeito fitotóxico dos compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína) determinados no desenvolvimento de sementes de corda-de-viola e trapoeraba (substrato papel).....69
- Figura 29** - Biomassa das plântulas de trapoeraba e corda-de-viola no ensaio alelopático com padrões de compostos fenólicos determinados nas sementes de *Canavalia ensiformis* (substrato papel).....70

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 01 - Distribuição Percentual da Utilização de Agroquímicos por Classe (VELASCO; CAPANEMA, 2006).....	5
Tabela 02 - Caracterização física e química do solo utilizado nos bioensaios de alelopatia.....	35
Tabela 03 - Massas dos extratos aquosos de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>	40
Tabela 04 – Condições empregadas para análise em HPLC de compostos fenólicos presentes em extratos aquosos de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i> (feijão-de-porco).....	42
Tabela 05 – Biomassa obtida no ensaio alelopático com a fração polar para as ervas daninhas trapoeraba e corda-de-viola.....	58
Tabela 06 - Tempo de retenção (tR) dos padrões de compostos fenólicos estudados e determinados no extrato de sementes de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>).....	66
Tabela 07 – Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os compostos fenólicos determinados.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

CTC - Capacidade de troca catiônica

CG - cromatografia em fase gasosa

G% = Percentagem de germinação

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, high performance liquid chromatography)

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (do inglês, high performance liquid chromatography-spectrometry of mass)

HPLC-NMR - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ressonância magnética nuclear

HPLC-MS-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas tandem (do inglês, high performance liquid chromatography-spectrometry of mass in tandem)

HOAc – Ácido acético

IUPAC – União Internacional de Química Aplicada

I% = percentagem de inibição

K_d - Coeficiente de adsorção

LOD - Limites de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

MeOH - Metanol

N = Número total de sementes colocadas para geminar

NBR – Normas Brasileiras

ODS - Octadecilsilica

ppb – parte por bilhão

ppt – parte por trilhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S = Coeficiente angular da curva analítica.

SG_{amostra} = sementes germinadas nas placas onde se aplicaram os extratos

SG_{controle} = Sementes germinadas no tratamento controle

S_{ni} = Número de sementes germinadas no enésimo dia

tR - Tempo de retenção

t_{1/2} - Tempo de meia-vida

TLC - cromatografia em camada delgada

UV-Vis – Ultravioleta visível

σ = Desvio padrão dos valores de Y no ponto de intercepto com a regressão linear

RESUMO

O presente trabalho teve como ênfase avaliar a atividade herbicida de aleloquímicos em extratos aquosos de sementes da *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) através de ensaios de alelopatia e determinação de compostos fenólicos com atividade alelopática, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com este objetivo realizaram-se bioensaios de germinação, medida do crescimento da radícula e produção de biomassa em placas de Petri, usando como substrato solo e papel e como planta alvo as ervas daninhas corda-de-viola (*Ipomoea sp.*) e trapoeraba (*Commelina sp.*). Para os ensaios de alelopatia foram preparados extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* em diferentes concentrações. Os bioensaios mostraram que os aleloquímicos presentes no extrato de feijão-de-porco quando aplicado em solo, têm um efeito fitotóxico menor do que aqueles bioensaios realizados em papel. Os resultados apontam que a espécie estudada apresenta potencial alelopático. Dentre os metabólitos secundários responsáveis pela atividade alelopática observada nos extratos desta espécie, estão os compostos fenólicos: ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína. As concentrações determinadas para os compostos fenólicos foram de 13,78 mg L⁻¹ para o ácido clorogênico, 3,75 mg L⁻¹ para o ácido ferúlico, 35,34 mg L⁻¹ para o ácido p-anísico e 7,83 mg L⁻¹ para a genisteína. Esses compostos apresentaram-se como fortes inibidores de germinação. Esta investigação mostra que na presença de solo os aleloquímicos presentes nesta leguminosa possivelmente diminuem sua atividade fitotóxica.

Palavras chaves: *Canavalia ensiformis*, alelopatia, bioerbicidas, HPLC.

ABSTRACT

The objective of the present work was to study the herbicide activity of the allelochemicals in aqueous extracts from *Canavalia ensiformis* seeds through the allelopathy assays and phenolic compounds determination with allelopathic activity, by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). With this goal, germination bioassays, radicle length and biomass production in Petri plates were done, using paper and soil as substrate and the weeds species *Ipomoea grandifolia* and *Commelinna benghalensis* as target plants. For the allelopathy assays aqueous extracts from *Canavalia ensiformis* seeds were prepared in different concentrations. The bioassays showed that the allelochemicals present in the *Canavalia ensiformis* seeds, has a less phytotoxic effect compared to the bioassays done in paper. The results show that the studied specie has allelopathic potential. Among the secondary metabolites responsables for that allelopathic activity in this specie, are founded the phenolic compounds: chlorogenic acid, ferulic acid, p-anisic acid and genistein. The concentrations for the phenolic compounds were determined: 13,78 mg L⁻¹ for chlorogenic acid, 3,75 mg L⁻¹ for ferulic acid, 35,34 mg L⁻¹ for p-anisic acid and 7,83 mg L⁻¹ for genistein. These compounds present themselves as strong germination inhibitors. This study shows that the allelochemicals present in the *Canavalia ensiformis* seeds have a lesser phytotoxic activity in soil.

Key words: *Canavalia ensiformis*, allelopathy, Bioherbicide, HPLC.

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Agroquímico

O aumento da população mundial a partir da segunda metade do século passado levou à necessidade de maior produtividade agrícola. Para tal, a modernização das técnicas de plantio fez-se necessária, além de um controle mais eficaz no combate de pragas, doenças e ervas daninhas. O uso de agroquímico tornou-se, então, comum nas propriedades agrícolas, como agente de controle de pragas, doenças e plantas daninhas.

Agroquímico quer dizer o mesmo que defensivo agrícola, agrotóxico, pesticida, praguicida ou biocida. Os termos agroquímico e defensivo agrícola são normalmente utilizados pelo setor industrial, enquanto os demais são empregados por agricultores, ecologistas e pesquisadores (VELASCO; CAPANEMA, 2006). O Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, inciso IV, define os agroquímicos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

Podem ser encontradas, ainda, diversas outras definições. Assim, pesticidas são utilizados no controle e combate de diferentes formas de vida, seja na agricultura ou em áreas urbanas (LARA, 1992).

O uso de pesticidas, em especial dos herbicidas, tem sido causa de grande preocupação, pois um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura moderna são os efeitos provenientes de seu uso contínuo. Alguns herbicidas apresentam longa persistência no meio ambiente, especialmente em solos, podendo tornar inviável a rotação de culturas, técnica esta essencial quando se visa ao cultivo sustentável (PROCOPIO et al., 2005).

A necessidade da redução do consumo de agroquímicos, em especial daqueles que causam dano ao ambiente, às comunidades microbiológicas e ao homem, tem aumentado o interesse na busca de alternativas de controle natural de pragas e doenças das espécies cultivadas. Esse controle pode ser feito alterando as condições ambientais, com o objetivo de dificultar o aparecimento da praga ou doença, ou utilizando seus inimigos naturais.

Uma das alternativas para minimizar os efeitos causados pelo uso prolongado de herbicidas é a fitorremediação. A fitorremediação utiliza sistemas vegetais para recuperar águas e solos contaminados por poluentes orgânicos ou inorgânicos. Esta área de estudo, embora não seja nova, tomou impulso nos últimos 10 anos, quando se verificou que a zona radicular das plantas apresenta a capacidade de biotransformar moléculas orgânicas exógenas. A rizosfera, como é denominada esta zona, tem sido desde então estudada por sua importante função de utilizar moléculas poluentes como fonte de nutrientes para os diversos microorganismos que coabitam essa região. As substâncias alvos da fitorremediação incluem metais (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se), compostos inorgânicos, elementos químicos radioativos (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos derivados de petróleo (BTEx), pesticidas e herbicidas (bentazona, compostos clorados, etc), explosivos, solventes clorados e resíduos orgânicos industriais (PCPs, PAHs), entre outros.

A fitorremediação baseia-se na tolerância que algumas plantas apresentam a determinados compostos, ou mecanismos de ação. Essa tolerância pode ser resultante de processos de translocação diferencial para outros tecidos da planta, e assim, posteriormente, podendo ser parcial ou completamente degradado; volatilizado; e/ou transformar-se em compostos menos tóxicos, os quais podem ser combinados e/ou ligados a tecidos das plantas (PROCOPIO et al., 2005).

1.2 - Agricultura e Meio Ambiente

O solo está constantemente sendo alterado para favorecer o crescimento de plantas cultivadas assim como evitar o aparecimento de plantas daninhas. As plantas daninhas constituem um grande problema para a agricultura e a necessidade de controlá-las é fundamental. Conforme a espécie, a densidade e a distribuição na lavoura, as perdas são significativas. As ervas daninhas prejudicam a cultura porque competem pela luz solar, pela água e pelos nutrientes, podendo, dependendo do nível de infestação e da espécie, dificultar a operação de colheita e comprometer a qualidade do produto final (ERASMO et al., 2004).

Considerando a importância, por exemplo, da soja e do feijão para a economia brasileira, torna-se necessário o investimento em tecnologia, visando à redução de custos de produção para aumentar o lucro dos produtores e para obtenção de produto final de melhor qualidade que não comprometa a saúde humana e o ambiente.

Analisando-se a cultura do feijão, observa-se que, em média, 20% a 30% do seu custo total de produção referem-se ao controle de plantas daninhas e no caso da soja, esse valor, com frequência, está acima dos 30% (PRODUÇÃO, 2007).

No Brasil, o setor de agroquímicos pode ser considerado estratégico. O uso de agroquímicos no controle de pragas nas diversas culturas é peça fundamental na manutenção da produtividade e da rentabilidade do agronegócio brasileiro. Como apresentado na Tabela 1, ao longo das últimas décadas houve uma mudança significativa no percentual de utilização dos agroquímicos, quanto a sua classe (VELASCO; CAPANEMA, 2006), havendo um aumento considerável na percentagem de utilização herbicidas na última década o que é indicativo do efeito do uso prolongado de herbicidas que levam a resistência de plantas daninhas aos herbicidas tradicionais.

Tabela 01 - Distribuição Percentual da Utilização de Agroquímicos por Classe (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

Classe de uso	1960	1970	1980	1996	2003
Herbicidas	20	35	41	48	50
Fungicidas	40	22	19	19	18
Inseticidas	37	37	35	28	25
Outros	3	6	5	5	7

Fonte: Anos 1960 a 1996 – Martins (2000); 2003 – diversas fontes.

A produção de compostos químicos naturais representa 7,5% do mercado de produtos naturais, farmacêuticos, veterinários e de proteção de plantas. Portanto, existe hoje um mercado promissor para os pesticidas naturais (JARDIM,

2007). No entanto, estudo mais elaborado sobre a dissipação desses pesticidas naturais no solo e no ar faz-se necessário, assim como os possíveis impactos ambientais negativos provocados pelo emprego desses biodefensivos.

Os herbicidas sintéticos têm uma grande variedade estrutural, com diferentes mecanismos de ação. Cada vez é mais difícil descobrir novas estruturas que sirvam de modelo para a síntese de herbicidas comerciais, e que sejam benignos para outras formas de vida (RADI; TERRONES, 2007).

1.3 - Plantas Daninhas

As plantas daninhas requerem para seu desenvolvimento os mesmos fatores exigidos pelas outras culturas, ou seja, água, luz, nutrientes e espaço físico, estabelecendo um processo competitivo quando cultura e plantas daninhas se desenvolvem conjuntamente. É importante lembrar que os efeitos negativos causados pela presença das plantas daninhas não devem ser atribuídos exclusivamente à competição, mas sim a uma resultante total de pressões ambientais, que podem ser diretas (competição, alelopatia, interferência na colheita e outras) e indiretas (hospedar insetos, doenças e outras). Esse efeito total denomina-se interferência (EMBRAPA, 2007). O grau de interferência imposto pelas plantas daninhas é determinado pela composição florística (pelas espécies que ocorrem na área e pela distribuição espacial da comunidade infestante) e pelo período de convivência entre as plantas daninhas e a cultura (SEIGLER, 1996).

A competição por nutrientes essenciais é de grande importância, pois esses na maioria das vezes são limitados.

A competição por espaço faz com que a planta assuma uma arquitetura diferente daquela que possui quando cresce livre da presença de outras plantas, porque o espaço que deveria ocupar já se encontra ocupado por outra planta (EMBRAPA, 2007).

Diversas plantas daninhas possuem capacidade alelopática que reduzem o desenvolvimento de outras plantas, como exemplo o capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), o capim-colchão (*Digitaria horizontalis*) e o capim-rabo-de-raposa (*Setaria faberil*). O grau de interferência das plantas daninhas pode variar de acordo com as condições climáticas e sistemas de produção (EMBRAPA, 2007). Os objetivos de se usar algum método de controle de plantas daninhas nas culturas são evitar perdas devido à competição; beneficiar as condições de colheita; evitar o aumento da infestação e proteger o ambiente.

Tanto a colheita manual quanto a mecânica pode ser prejudicada devido à presença de plantas daninhas. No caso da colheita manual a presença da espécie *Mimosa invisa* Mart. Ex Colla, popularmente conhecida como malistra ou dormideira, pode provocar ferimentos nas mãos dos trabalhadores. A colheita mecânica quando realizada em lavouras com alta infestação de corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis*) pode ser inviabilizada, pois a máquina não consegue operar devido ao embuchamento dos componentes da plataforma de corte (EMBRAPA, 2007).

Considerando-se que o banco de sementes das plantas daninhas é o solo, se nada é feito para evitar a produção de sementes, o número de plantas daninhas emergindo a cada ano tende a aumentar significativamente, levando a perda na produção, aumento da dependência do uso de herbicidas e, conseqüentemente, aumentando os custos com controle.

O controle da população de plantas daninhas é um dos fatores primordiais em um sistema de produção sustentado. Para isso podem ser adotadas algumas técnicas como rotação de culturas e semeadura de plantas de cobertura e de adubação verde.

A adoção de métodos de controle de plantas daninhas que minimizem ou dispensem o uso de herbicidas são desejáveis para tornar a atividade agrícola ambientalmente mais segura, pois, herbicidas são substâncias químicas que apresentam diferentes características físico-químicas e, portanto, um comportamento ambiental diferenciado. Dependendo dessas características, como o coeficiente de adsorção (K_d), a constante de Henry e, principalmente, a meia-vida ($t_{1/2}$) do composto no solo, ar e água, o herbicida usado pode ser uma fonte de contaminação do ambiente (EMBRAPA, 2007). Produtos voláteis poderão contaminar o ar, produtos lixiviáveis poderão atingir o lençol freático e os herbicidas ligados em solos poderão atingir depósitos de águas superficiais, por meio da erosão (EMBRAPA, 2007).

Diversos são os métodos de controle de plantas daninhas empregados, dentre os quais podem-se destacar:

Controle Preventivo: o controle preventivo tem como objetivo evitar a introdução ou disseminação de plantas daninhas nas áreas de produção. Para tal, buscam-se a utilização de sementes de boa procedência, livres de sementes de plantas daninhas e limpeza de máquinas e implementos fora da área a ser cultivada para evitar a disseminação de sementes de plantas daninhas e de outras estruturas de reprodução.

Controle Cultural: embora não seja uma técnica de manejo de plantas daninhas, este método cultural visa a aumentar a capacidade competitiva da cultura em

detrimento das plantas daninhas. Uso de variedades adaptadas às regiões, uso de cobertura morta, adubações adequadas e rotação de culturas são algumas das técnicas que permitem a cultura tornar-se mais competitiva com as plantas daninhas.

Controle Mecânico: tanto a capina manual quanto a mecânica são métodos amplamente utilizados por agricultores de pequenas e médias propriedades.

Controle Químico: o controle químico consiste na utilização de produtos herbicidas para o controle das plantas daninhas. Ao se pensar em controle químico, algumas considerações devem ser feitas: i - a seletividade do herbicida para a cultura, ii - a eficiência no controle das principais espécies na área cultivada e iii - o efeito residual dos herbicidas para as culturas que serão implantadas em sucessão à atual. Embora seja, ultimamente, o método de controle com maior crescimento, o controle químico, se utilizado indiscriminadamente, pode vir a causar problemas de contaminação ambiental, a longa persistência no meio ambiente poderá afetar o desenvolvimento de culturas subseqüentes, ser tóxico aos seres vivos, levar a resistência das ervas daninhas aos herbicidas tradicionais. Cuidados adicionais devem ser tomados com o descarte de embalagens, armazenamento, manuseio e aplicação dos herbicidas (EMBRAPA, 2007).

1.4 – Alelopatia

A alelopatia é uma ciência que cada vez está adquirindo mais importância no âmbito da investigação agrária para a luta natural contra as pragas e contra a invasão de parasitas e ervas daninhas nas plantações. É encarregada de estudar os processos nos quais estão envolvidas substâncias produzidas por

organismos de origem vegetal que influenciam no desenvolvimento de sistemas biológicos.

Em 1937, o pesquisador alemão Hans Molisch sugeriu pela primeira vez o termo alelopatia para se referir às interações inibitórias e de estimulação entre todos os tipos de plantas, incluindo os microrganismos. O termo “alelopatia” surgiu a partir da união das palavras gregas “*allelon*” e “*pathos*”, que significam, respectivamente, mútuos e prejuízo (MALHEIROS; PERES, 2001, RICE, 1984).

Segundo Rice (1984), alelopatia é a capacidade dos vegetais produzirem substâncias químicas que, quando liberadas no ambiente, influenciam de forma favorável ou desfavorável o desenvolvimento de outros organismos.

A Sociedade Internacional de Alelopatia define alelopatia como: “Ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos” (PINTO et al., 2002).

Metabólitos secundários são substâncias que geralmente não estão envolvidas em funções vitais das plantas, geralmente não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e às vezes bem complexa. Podem ser produzidos por plantas, microrganismos, insetos e outros animais e muitos deles são extraídos e usados como remédios, corantes, perfumes, inseticidas ou constituem um modelo que o homem utiliza para sintetizar em laboratório substâncias com as mais diversas propriedades. Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações. Chegaram a ser considerados até como anomalias. Essa visão mudou radicalmente e a cada dia

descobre-se um pouco mais sobre a função dessas substâncias, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores as interações entre as plantas e outros organismos. A figura 1 mostra a rota de formação dos metabólitos secundários (INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS, 2008).

Figura 1 – Rota de formação de metabólitos secundários nas plantas (fonte: <http://www.geocities.com/~esabio/interacao/metabolitos.htm>).

Desde a Antiguidade tem-se a noção de que algumas espécies de plantas têm a capacidade de interferir no desenvolvimento de outras, podendo inibir ou estimular seu crescimento mediante a liberação de substâncias químicas na atmosfera ou no solo, as quais apresentam características alelopáticas (DURIGAN; ALMEIDA, 1993). De fato, os cientistas têm observado uma interferência causada por algumas plantas sobre o desenvolvimento de outras espécies, sendo essas interferências raramente provocadas por uma única substância, mas sim por várias (SABIO INSTITUTO, 2007).

A forma de atuação dos compostos alelopáticos tampouco é específica, apresentando com maior frequência prejuízos em funções vitais, tais como, assimilação de nutrientes, crescimento, fotossíntese, respiração, permeabilidade da membrana celular, atividade enzimática e síntese de proteínas (PERIOTTO et al., 2003). O efeito morfológico dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores. Assim, os efeitos de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de efeitos ocorridos inicialmente em níveis molecular e celular (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

O modo de ação dos compostos alelopáticos poder ser direto ou indireto. Como ações indiretas podem-se incluir alterações nas propriedades do solo, em suas condições nutricionais e em populações e/ou atividade dos microrganismos, já o modo direto ocorre quando o aleloquímico se liga às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Os efeitos alelopáticos são mediados através de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de compostos, tais como fenóis, terpenos,

alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros. Esses compostos químicos podem estar presentes em maior ou menor proporção, nas folhas, ramos, raízes, caules e sementes. A liberação dos mesmos no meio ambiente se dá pela decomposição de resíduos vegetais, lixiviação, volatilização, exsudação pelas raízes, sendo que, a maioria provém do metabolismo secundário vegetal que na evolução das plantas tiveram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, insetos, vírus e outros tipos de agentes patógenos ou predadores (ERASMO et al., 2004; MARASCHIN-SILVA, 2004). Dentre as substâncias químicas que atuam nessa interação podem ser destacadas as saponinas, os taninos e os flavonóides (SANTOS, 2004; MALHEIROS; PERES, 2001, RICE, 1984).

A atividade alelopática raramente é resultado de uma única substância, sendo mais comum o efeito sinérgico, ou seja, um conjunto de substâncias apresentando atividade. Assim, torna-se difícil o entendimento dos processos envolvidos pelo fato de um mesmo composto influenciar várias funções biológicas e a mesma função poder ser influenciada por mais de um composto. Cumarinas, por exemplo, podem interferir na respiração, porém, esta mesma função pode ser influenciada por compostos fenólicos, aromáticos e aldeídos (MALHEIROS; PERES, 2001). O composto (E)-2-hexenal inibe a germinação das sementes de tomate; as quinonas sorgoleona e juglona interferem na produção de ATP; os ácidos ferúlico e *p*-cumárico influenciam a germinação de canola; monoterpenos como α -pineno, β -pineno e limoneno inibem o ciclo do nitrogênio (MALHEIROS; PERES, 2001).

Os recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, têm contribuído para melhorar o conhecimento de inúmeros aleloquímicos pertencentes a diferentes classes de compostos (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

No Brasil, assim como em outros países, estudos sobre alelopatia têm-se concentrado em plantas do agro-ecossistema. Entretanto, considerando-se a extensão territorial e a biodiversidade da flora brasileira vê-se que há muito a ser pesquisado sobre espécies nativas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Dentre as espécies, cujo potencial alelopático já foi investigado, podem ser citados como exemplos, a marica (*Mimosa bimucronata*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e carvalho brasileiro (*Roupala brasiliensis*), entre outras (MARASCHIN-SILVA, 2004).

Pesquisas recentes mostram que determinadas plantas desenvolveram um sofisticado sistema de defesa para proteção contra herbívoros predadores. Um dos exemplos é a estratégia de defesa do milho (*Zea mays*) contra a lagarta *Spodoptera exigua*. O milho quando é atacado por este predador emite uma mistura de substâncias voláteis constituída de indol, mono e sesquiterpenos, que atrai fêmeas da vespa parasita *Cotesia marginiventris*, um predador natural da lagarta. Estas substâncias são liberadas quando a secreção oral do herbívoro entra em contato com o tecido ferido da planta (PINTO et al., 2002).

Para uma melhor compreensão dos efeitos alelopáticos, é indispensável o conhecimento da natureza química dos compostos secundários intervenientes. Para tal, o estudo sobre como isolar e identificar as estruturas químicas desses compostos é fundamental (DURIGAN; ALMEIDA, 1993).

A maior parte dos aleloquímicos é liberada na natureza na forma de solutos aquosos, por isso deve-se evitar a extração com solventes orgânicos (clorofórmio, éter, álcool etc.), pois como na natureza isto não ocorre, poder-se-iam liberar compostos que em condições naturais não atuariam alelopaticamente (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; MIRÓ et al., 1998).

Neste contexto, a produtividade, a redução dos problemas ambientais e os custos com a proteção de plantas são parâmetros a serem considerados quando se buscam produtos que possam ser empregados como agroquímicos. Sendo assim, o presente trabalho pretende contribuir para o melhor entendimento dos processos alelopáticos, assim como na determinação de novos compostos que possam atuar alelopaticamente. O emprego de extratos aquosos na realização dos testes de germinação é justificado uma vez que esse é o solvente na natureza.

1.4.1 - Alelopatia na Germinação

A fase de germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que a fase do crescimento da plântula. Os aleloquímicos podem induzir ao aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Assim, a avaliação das plântulas é um instrumento valioso e qualitativo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Muitas vezes o efeito alelopático não se dá sobre a germinabilidade, ou seja, no percentual final de germinação, mas sobre outros parâmetros do processo, como exemplo, a velocidade de germinação (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Alterações nos padrões de germinação podem ser resultado de efeitos sobre a permeabilidade de membranas, a transcrição e tradução do DNA; do funcionamento dos mensageiros secundários; da respiração, por seqüestro de oxigênio (fenóis); da conformação das enzimas e de receptores ou, ainda, da combinação desses fatores (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; RIZVI; RIZVI, 1992).

Os testes de germinação são simples, no entanto, deve-se ter uma série de cuidados para que as respostas possam ser reprodutíveis. Os testes podem

ser realizados em laboratório à temperatura ambiente, porém, como a temperatura influi sobre a germinação e a ação alelopática, é desejável o controle da mesma. Assim, é comum o estudo à temperatura entre 22 e 28°C (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). A umidade das placas também é importante, deve-se cuidar para que estas não sequem.

1.5 - *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco)

O feijão-de-de-porco (Figura 2), *Canavalia ensiformis*, é uma planta tropical, da família Fabaceae, amplamente cultivada nos países tropicais como cobertura verde o que dispensa a utilização de nitrogênio devido a associação simbiótica das raízes dessas plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio (WIKIPÉDIA, 2007). Na natureza, esta planta é relativamente livre do ataque de pragas e doenças (SANTOS, 2004). Anaya¹ (1999 apud SOUZA FILHO, 2006) constatou que quando adicionadas em solo, ou seja, usada como cobertura verde há uma redução no índice de incidência de nematóides de raízes de tomateiros em mais de 50%.

Estudos fitoquímicos têm mostrado que a *Canavalia ensiformis* é fonte de diferentes classes de compostos como saponinas, cianoglicosídeos, terpenóides, alcalóides, taninos, flavonóides (SANTOS, 2004; UDEDIBIE; CARLINI, 1998).

¹ ANAYA, A.L. Allelopathy as too in the management of biotic resouces in agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 697-739, 1999.

Figura 02 – *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) (a - planta, b-sementes)

Do feijão-de-porco têm sido extraídos os princípios ativos que agem como inseticidas, herbicidas e fungicidas. Recentemente, a Radiobrás anunciou a descoberta nessa planta de uma proteína semelhante à insulina (WIKIPÉDIA, 2007). A *Canavalia ensiformis* é também conhecidamente eficiente no manejo de tírca (*Cyperus* sp) (Souza Filho, 2006).

O efeito alelopático de extratos das folhas de *Canavalia ensiformis* sobre a germinação de sementes das espécies de ervas daninhas, *Mimosa pudica* (malícia), *Cássia tora* L. (mata pasto) e *Cássia occidentalis* L. (fedegoso) foram avaliados, no grupo de Química Ambiental do IQSC/USP, mostrando-se certa especificidade das plantas com relação aos extratos orgânicos obtidos (SANTOS et al., 2005; SANTOS, 2004).

Em estudo realizado por Souza Filho (2002) utilizando-se extratos hidroalcoólicos de diferentes partes da leguminosa feijão-de-porco, observou-se que os extratos de sementes de feijão-de-porco apresentavam-se com maior atividade alelopática.

Posteriormente, Santos (2004) observou que os extratos provenientes das sementes de feijão-de-porco apresentaram maior influência na inibição da germinação de sementes de gramíneas e ervas daninhas, enquanto que nos extratos obtidos das raízes os efeitos foram menores.

1.6 - Compostos Fenólicos

Como se sabe, o fenômeno da alelopatia está envolvido em várias interações bioquímicas entre as plantas. Considerando o efeito alelopático de metabólitos secundários, é reconhecido que terpenóides, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos presentes nas frações voláteis dos vegetais, assim como compostos fenólicos, são os principais responsáveis pela inibição de crescimento de outras plantas (HARBORNE, 1993).

As interações de plantas com seu ambiente são em grande parte influenciadas pelos compostos fenólicos, os quais são os principais compostos alelopáticos que inibem a germinação de sementes, o crescimento de plantas e outros processos fisiológicos. (HARBORNE, 1993)

Polifenóis como taninos, flavonóides e ácidos fenólicos são os compostos com atividade alelopática mais encontrados em extratos de espécies vegetais. Os taninos formam complexos irreversíveis com proteínas, podendo inibir processos enzimáticos. Estudos demonstram que estas substâncias interagem com sistemas biológicos como vírus e bactérias e participam de reações enzimáticas, além de ser um antioxidantes, podendo estar relacionadas com o processo de inibição de germinação e crescimento de plantas (DE BRUYNE *et al.*, 1999).

Dentre os grupos de compostos fenólicos que apresenta ação alelopática encontra-se o de flavonóides. Vários flavonóides encontrados, por exemplo, nas espécies de *Hypericum*, como quercetina, isoquercitrina, rutina, entre outros, são relatados pelo seu efeito sobre o crescimento de plantas (PARVEZ *et al.*, 2004; RIVERA-VARGAS, *et al.*, 1993).

Os compostos fenólicos possuem em comum um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxila associados diretamente à estrutura cíclica. Compostos fenólicos tendem a ser solúveis em água e podem estar ligados a açúcares. Do ponto de vista farmacológico possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória e podem inibir atividade enzimática (HARBORNE, 1993).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio (MAMEDE; PASTORE, 2004). A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE; PASTORE, 2004). A maioria dos compostos fenólicos são solúveis em água e ocorrem na forma de glicosídeos. Eles são originados pela via do ácido chiquímico e acumulam-se nos vacúolos das células vegetais (PAIVA, 1998).

Estudos feitos por McPherson² e Muller (1968, apud HARBORNE, 1993) indicaram que dentre os compostos fenólicos isolados de folhas de *Adenostoma* e *Arctostaphylos* os que apresentaram maior efeito na inibição da germinação de sementes de gramas e outras ervas foram os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, sendo esses compostos encontrados no solo. Naquele estudo, McPherson² e Muller (1968, apud HARBORNE, 1993) observaram que em ambas as

² MCPHERSON, J. K.; MULLER, C.H. (1969). Ecol. Monogr. 39, 177-198.

plantas estudadas, as substâncias responsáveis pelos efeitos alelopáticos são solúveis em água, sendo, portanto e transportados por água.

As plantas superiores, em condições adequadas, produzem várias substâncias denominadas metabólitos secundários os quais, em sua maioria são de natureza fenólica (PAIVA, 1998). Segundo Harborne (1993), compostos fenólicos são eficientes na inibição de germinação de sementes.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas estão relacionados, principalmente, com a proteção (PUTMAN³, 1989 apud AGOSTINI-COSTA et al., 2000), exercendo efeito sobre microorganismos que as infectam e animais.

Os flavonóides são compostos derivados do núcleo flavona, sendo que as várias classes são diferenciadas entre si pelo grau de insaturação e de oxidação no segmento dos três carbonos intermediários (ROBARDS, 1997).

Flavonóides são comumente extraídos de material vegetal com metanol, etanol ou combinação destes com água (WACH et al., 2007). Flavonóides, e particularmente derivados de quercetina, têm recebido especial atenção como constituintes dietéticos nos últimos anos (WACH et al., 2007).

Os flavonóis e as flavonas mais encontrados nas plantas são aqueles com hidroxilação nas posições 3 e carbonila na posição 4, seguido por aqueles com grupo hidroxila na posição 4, a quercetina e o Caempferol, respectivamente, são flavonóis típicos que apresentam estas estruturas (DIAGONE, 2003). Quercetina, rutina e Caempferol são flavonóides bastante encontrados na natureza (TIBERTI, 1998).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos, a saber: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do

³ PUTMAN, L. J, BUTLER, L. G. Separation of high weight sorghum procyanidins by high performance liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 37, p. 943946, 1989.

ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004)

Na classe dos fenóis ácidos estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, freqüentemente na forma de ésteres de ácido tartárico, como exemplo, o ácido ferúlico (BARANOWSKI⁴; NAGEL, 1981 apud MAMEDE; PASTORE, 2004), os quais, segundo Harborne (1993), são eficientes na inibição de germinação de sementes.

Misturas dos ácidos fenólicos, vanílico e p-hidroxibenzóico apresentam-se mais efetivas na inibição do crescimento de plantas do que quando aplicadas separadamente, o que indica ação sinérgica (HARBORNE, 1993). A ação de ácidos fenólicos no solo não é completamente conhecida, porém sabe-se que alguns microrganismos promovem a liberação dos mesmos a partir da decomposição de restos vegetais, então há necessidade de maior pesquisa no que se refere à eficácia e modo de ação desses compostos na inibição da germinação (HARBORNE, 1993).

Os compostos fenólicos (Figura 3) estudados neste trabalho foram escolhidos com base no trabalho realizado por Santos (2004) utilizando-se folhas, raízes e sementes da *Canavalia ensiformis*.

⁴ BARANOWSKI, J.D.; NAGEL, C. W. Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white riesling wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 32, n. 1, p. 5-13, 1981.

Figura 03 – Estrutura dos compostos fenólicos estudados

1.7 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica cromatográfica que utiliza como fase móvel um líquido e fase estacionária líquida ou sólida para separar os componentes de uma amostra, pela interação destes com a fase móvel. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

A técnica HPLC faz análises mais rápidas do que a cromatografia clássica, com alta resolução e eficiência. Dependendo do detector pode atingir sensibilidade em nível de parte por bilhão (ppb) ou trilhão (ppt) (SKOOG et al., 2002).

Dentre as técnicas analíticas de separação, a HPLC é a mais usada, possuindo alta sensibilidade, fácil adaptação em determinações quantitativas acuradas, adequação a separações de espécies não voláteis ou termicamente instáveis, ampla aplicabilidade a substâncias, como exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, aminoácidos, carboidratos terpenóides, pesticidas, dentre outras (SKOOG et al., 2002).

Um sistema de HPLC (Figura 4) consiste basicamente de: reservatório, sistema de bombeamento da fase móvel, injetor, coluna, detector e um registrador de dados (SKOOG, et al., 2002; CIOLA et al., 1998).

Figura 04 – Esquema de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A instrumentação necessária para análise em HPLC é extremamente sofisticada. O desenvolvimento de colunas com fases estacionárias preparadas com partículas de diâmetros menores a aqueles utilizados pela Cromatografia Líquida Clássica tornou necessária a utilização de sistemas de bombeamento mais eficientes.

Apesar de seu alto custo com os solventes e equipamentos empregados, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica que vêm sendo amplamente utilizada para análises de fitoquímicos e demonstra ser uma técnica muito versátil na análise quantitativa de plantas (CELEGHINI, 1997).

Em estudos de metabólitos secundários vegetais, por exemplo, muitas amostras contêm compostos polares e não voláteis, sendo assim a cromatografia líquida, combinada com um detector de UV-Vis, é o sistema escolhido para

isolamento e detecção dos metabólitos de interesse. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica que compreende uma grande variedade de modos de separação. Portanto é possível otimizar um sistema de separação através da combinação entre as diversas fases móveis e estacionárias que este sistema permite (MARASCHIN; VERPOORTE, 2001).

As fases estacionárias empregadas na HPLC podem ser classificadas de acordo com o mecanismo pelo quais estas separam as moléculas: partição, adsorção, troca iônica e exclusão por tamanho. A fase reversa é a fase estacionária mais utilizada em cromatografia líquida. A fase reversa separa por partição e adsorção, através de grupos silanol não protegidos. Neste sistema, os compostos são adsorvidos à fase estacionária (de menor polaridade) até serem eluídos pela fase móvel com polaridade adequada à separação (MARASCHIN; VERPOORTE, 2001).

Na análise de flavonóides são muito utilizadas as colunas C18 (octadecilsílica) do tipo fase reversa (MORAIS, 1995). Atualmente são também utilizadas a eletroforese capilar e a cromatografia gasosa para análises de compostos. No entanto, para análise através da técnica de cromatografia gasosa os compostos devem possuir pontos de ebulição até 300°C, serem termicamente estáveis com massa molar menor que 500 g mol⁻¹ não apresentando grupos carboxílicos, grupos hidroxilas ou amino, pois estes podem ser retidos na coluna cromatográfica (CECHINEL; YUNES, 2001). Portanto o inconveniente para análise desses compostos é a necessidade de derivatização para determinação em cromatografia gasosa.

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos, mas não de confirmação da identidade. Cromatografia apenas fornece dados

auxiliares na identificação. Algumas técnicas são comumente empregadas para auxiliar na identificação de compostos como: comparação do tempo de retenção do composto com o dos padrões e adição de padrão (SKOOG, *et al.*, 2002; CIOLA *et al.*, 1998; LANÇAS, 1993). Uma coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão significa que o analito talvez seja o mesmo composto que o padrão. Caso negativo pode-se afirmar que não é. No primeiro caso, a análise merece progredir para uma etapa de confirmação de identidade. No segundo caso, o analista está diante de uma negativa, isto é, o composto não é o que se supunha inicialmente.

Tanto a adição de padrão quanto a análise pelo tempo de retenção são muito utilizadas para comprovar que um composto com certo tempo de retenção é ou não o composto que se julgava ser (SKOOG, *et al.*, 2002; CIOLA *et al.*, 1998; LANÇAS, 1993).

São aceitas por vários países da Europa como métodos oficiais de controle de qualidade de fitoterápicos, várias técnicas cromatográficas como: cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa (CG) (EVANS, 1989).

O detector é a parte do equipamento que mede de forma contínua alguma propriedade física dos componentes da amostra, que são separados na coluna analítica, enviando como resposta um sinal elétrico que será registrado no processador como um pico (CECCHI, 2003).

Existem vários tipos de detectores que podem ser utilizados, dependendo do tipo de composto que será analisado. Porém todos devem ter: alta sensibilidade; baixo nível de ruído; ampla faixa de linearidade; alta estabilidade; boa repetibilidade; limite mínimo de detecção (CECCHI, 2003).

O detector mais utilizado para separações por HPLC é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência de índice de refração e eletroquímicos, entre outros (DEGANI *et al.*, 1998).

O detector UV-Visível tem como princípio a absorção de luz ultravioleta ou visível por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética. É um detector seletivo para moléculas que possuem grupos cromóforos.

Há três diferentes tipos de equipamentos operando de acordo com o princípio descrito: os fotômetros de comprimento de onda fixo, os espectrofotômetros e os detectores por arranjo de fotodiodos.

Os fotômetros de comprimentos de onda fixo têm sua aplicação restrita a molécula que absorvam no comprimento de onda em que eles trabalham.

Os espectrofotômetros permitem a escolha do comprimento de onda mais adequado a cada análise. Estes podem emitir luz no ultravioleta, de 190 a 400 nm, através de lâmpada de deutério e na região do visível, de 350 a 900 nm, utilizando-se lâmpadas de tungstênio.

Os detectores de fotodiodos fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. São muito úteis para desenvolvimento de métodos, pois possibilitam uma varredura da região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, medidas de pureza de pico e para análise de amostras desconhecidas (CASS; DEGANI, 2001).

A utilização do comprimento de onda máximo do analito é recomendada para que não haja interferência da fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

Atualmente, a possibilidade do emprego de técnicas hifenadas ou técnicas acopladas pode ajudar, em parte, os estudos em Produtos Naturais. Apesar

de extratos vegetais serem misturas complexas de diferentes metabólitos, a análise de frações voláteis ou materiais apolares de superfícies foliares já é, há muito tempo realizada, não sendo necessário muitas vezes, nenhum fracionamento para a total caracterização química do material em estudo (PINTO *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS) é atualmente o método mais sensível de análise e o melhor para o emprego em quantificação (WOLFENDER *et al.*, 1998). Contudo, a técnica mais poderosa para determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e, principalmente, em misturas biologicamente ativas é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ressonância magnética nuclear (HPLC-NMR), porém o alto preço do equipamento ainda é um inconveniente (PINTO *et al.*, 2002).

Para compostos que apresentam grupos cromóforos, o detector de arranjo de diodos (DAD) é normalmente empregado; caso contrário, a detecção é feita pelo detector seletivo de massas. No estudo, por exemplo, de plantas medicinais, na maioria das vezes, torna-se necessário o uso de técnicas complementares para a identificação dos componentes ativos, como o caso da combinação entre HPLC-NMR, HPLC-DAD (cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos) e HPLC-MS-MS (cromatografia líquida com detector seletivo de massas tandem), graças à complexidade do problema (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Vários estudos com metabólitos secundários utilizando-se da cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de UV-Vis têm sido realizados (DIAGONE, 2003; TIBERTI, 1998; CELEGHINI, 1997; MORAIS, 1995).

Objetivos

2 – OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é dar continuidade ao estudo alelopático de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) buscando:

- avaliar o potencial alelopático de extratos aquosos de sementes de feijão-de-porco frente às espécies dicotiledôneas de plantas daninhas, *Commelina benghalensis* (trapoeraba) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), pelos parâmetros: crescimento radicular, índice de inibição, velocidade de germinação e produção de biomassa.
- avaliar a influência do substrato (solo e papel) sobre os parâmetros: crescimento radicular, índice de inibição, velocidade de germinação e produção de biomassa.
- determinar os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso através de HPLC/UV-Vis.

Experimental

3. EXPERIMENTAL

3.1- *Materiais*

3.1.1 – Padrões

- Ácido clorogênico (Fluka)
- Ácido ferúlico (Fluka)
- Ácido p-anísico (Acros)
- Rutina (Acros)
- Naringina (Fluka)
- Quercetina (Acros)
- Genisteína (Sigma)
- Caempferol (Harmful)

3.1.2 – Solventes

- Água Milli-Q – Sistema Millipore Waters
- Acetonitrila – Mallinckrodt (grau HPLC)
- Ácido fórmico – Synth (P.A)
- Metanol – Tedia (grau HPLC)
- Acetato de Etila – Mallinckrodt (grau HPLC)
- Diclorometano – Tedia (grau HPLC)
- Hexano – Mallinckrodt (grau HPLC)
- Benzeno – Synth (P.A)

3.1.3 – Equipamentos

- Câmara de Germinação–TE 401
TECNAL
- Centrifuga HITACHI - himac CR
20B2
- Rota evaporador – FISATOM
- Ultra-som – BRANSON 2510
- Sistema HPLC Shimadzu
- Moinho tipo Willey
- Espectrofotômetro UV-Vis-JASCO
V-630
- Agitador - QUIMIS
- pHmetro - pH Meter Tec-2 –
TECNAL
- Balança Analítica – SCIENTECH
AS 210
- Balança Semi Analítica – BG
1000 GEHAKA
- Estufa – QUIMIS

3.1.4 - Outros Materiais

- Sílica gel 60 para coluna
cromatográfica - MERCK
- Sulfato de sódio anidro
(Na₂SO₄)–MERCK
- Nistatina
- Hipoclorito de Sódio
- Hidróxido de sódio – Synth
- Nitrogênio (N₂) ultra puro
- Filtro seringa Cel Reg 0,45 µm de
diâmetro (Minisart RC 15) para
filtração
- Papel de filtro comum
- Solo

3.2 - Estudos do Potencial Alelopático do Extrato Aquoso de Sementes de *Canavalia Ensiformis* (Feijão-de-Porco)

3.2.1 - Coleta

As sementes da planta em estudo foram coletadas em latossolo amarelo na região amazônica, município Paragominas – Pará, e pertencem à família das leguminosas, da espécie *Canavalia ensiformis*.

As sementes de ervas daninhas e de soja utilizadas nos bioensaios foram cedidas pelo Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sendo as ervas daninhas adquiridas da empresa Shokucho de Campinas-SP e as sementes de soja da COODETEC de Cascavel – PR.

Considerando a importância econômica da cultura de soja para o Brasil as sementes de ervas daninhas foram escolhidas de acordo com a maior incidência em plantações de soja.

Neste trabalho, a ênfase foi estudar o potencial alelopático de sementes de feijão-de-porco sobre as plantas daninhas, geralmente encontradas em plantações de soja. Assim, pensando-se em trabalho futuro, que avalie a utilização do bioerbicida extraído das sementes de feijão-de-porco, em larga escala, iniciou-se um estudo sobre o potencial alelopático em sementes de soja.

O solo utilizado nos experimentos foi proveniente do município de São Carlos-SP, na Fazenda Invernada, localizada na latitude 22°02' sul e longitude 47°55' oeste, coletado da camada arável de um latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. O emprego do solo íntegro teve como objetivo um estudo preliminar sobre

o comportamento dos aleloquímicos quando aplicados em substrato solo em comparação com o substrato papel. As principais características físicas e químicas do solo estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 02 – Caracterização física e química do solo utilizado nos bioensaios de alelopatia

Características	Valores
pH ^a	4,51 ± 0,01
Carbono orgânico (g kg ⁻¹) ^b	8,55 ± 0,30
Umidade (%) ^c	7,012 ± 0,090
Teor de matéria orgânica (%) ^d	1,463 ± 0,052
CTC (cmol _c kg ⁻¹) ^e	1,32 ± 0,00
Argila (%) ^f	3,3
Silte (%)	6,7
Areia (%)	90

^aDeterminação da atividade hidrogeniônica de uma suspensão com 25,00 mL de solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹ e 10,00g de cada amostra coletada. ^bMedidor de carbono total, modelo TOC-V_{CPH}, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM – 5000A, marca SHIMADZU, com detector de combustão. ^cEm estufa a 60-65°C e a 100-110°C. ^dCalcinação em mufla a 500°C por 4h. ^eSuspensão em CH₃COOH. ^fJogo de peneiras de números: 16, 40, 60, 100 e 230, as quais foram agitadas em mesa agitadora por 10 min. As determinações da fração de silte e argila foram feitas pelo método do densímetro, segundo norma técnica (NBR).

3.2.2 – Obtenção dos Extratos Aquosos Brutos

A secagem das sementes de feijão-de-porco foi realizada à temperatura ambiente, com pesagens diárias até valor constante. Após este processo, as sementes foram armazenadas sendo trituradas somente quando

realizadas as extrações, a fim de evitar possíveis perdas de substâncias por volatilização e/ou degradação.

Para a preparação dos extratos utilizados nos bioensaios, o material vegetal foi triturado em moinho, sendo posteriormente extraído na proporção de 250,0 g em 2 X 1 L de água desionizada (0,1% KCl). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas com posterior filtração em tecido de algodão, sendo o material sólido novamente extraído com 1L de água desionizada (0,1% KCl), deixando-o sob agitação por mais 24 horas, perfazendo um total de 48 horas de extração. O extrato obtido foi submetido à centrifugação a 7000 rpm por 20 min a 20°C, por três vezes, sucessivamente. A centrifugação foi realizada para promover a remoção de partículas sólidas sobrenadantes indesejáveis. O extrato foi levado à evaporação a 50°C em rota evaporador acoplado a vácuo, até obtenção do extrato sólido.

O material “sólido” foi deixado sob vácuo em um dessecador contendo sílica desidratante, até obtenção do material seco. Posteriormente, o material foi pesado, a partir de então prepararam-se extratos nas concentrações 2; 4; 6; 8 e 10 g L⁻¹, para serem utilizados nos respectivos bioensaios (SANTOS, 2004; HEISEY, 1996).

3.2.3 - Avaliação do Potencial Alelopático

Para a realização dos bioensaios necessários à avaliação do potencial alelopático foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro ou solo (5 g). Em cada placa aplicaram-se os extratos aquosos brutos nas

diferentes concentrações a fim de avaliar o efeito da concentração dos mesmos sobre a germinação das sementes de trapoeraba, corda-de-viola e soja.

Para evitar a proliferação de fungos nas placas, as mesmas foram lavadas com solução de hipoclorito 10%.

Em cada placa contendo o substrato papel ou solo (5 g), aplicou-se 5,0 mL das soluções dos extratos aquosos ($2-10 \text{ g L}^{-1}$). As placas foram deixadas abertas em estufa a 30°C até a evaporação do solvente (água). Em seguida, o papel de filtro e/ou solo foi umedecido com 3,0 mL da solução 0,2% de nistatina, sendo, a seguir, as sementes distribuídas nas placas de Petri, recebendo um total de 15 e/ou 25 sementes. A germinação foi conduzida em câmara de germinação à temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 20 dias no caso das sementes de trapoeraba e 7 a 15 dias para as demais sementes com contagem diária para avaliação da germinação.

Os tratamentos constaram de 25 sementes por placa para trapoeraba e corda-de-viola e 15 para soja, com três replicas simultaneamente. A comparação foi realizada fazendo-se uso de um tratamento testemunha (controle) no qual se empregaram 5,0 mL do solvente utilizado nas soluções dos extratos (água) e, após a evaporação do mesmo 3,0 mL da solução de nistatina 0,2%, seguindo a partir de então os mesmos procedimentos realizados para os testes de germinação nas placas onde foram aplicados os extratos aquosos. A conclusão do experimento foi considerada quando a germinação foi nula, por duas contagens consecutivas. Os dados obtidos foram calculados segundo a porcentagem de germinação (G%), porcentagem de inibição (I%), crescimento radicular e biomassa produzida.

Os cálculos da porcentagem de germinação foram obtidos segundo a equação a seguir (FERREIRA; BORHETTI, 2004; OLIVEIRA et al., 2002).

$$G\% = 100 \times S_{ni}/N$$

Onde:

G% = Percentagem de germinação

S_{ni} = Número de sementes germinadas no i-ésimo dia

N = Número total de sementes colocadas para germinar em cada placa

A percentagem de germinação (G%) foi utilizada para determinar a velocidade de germinação

A percentagem de inibição da germinação (I%) das sementes de plantas daninhas foi calculada utilizando a equação a seguir (SANTOS, 2004).

$$I\% = [1 - (SG_{amostra}/SG_{controle})] \times 100$$

Onde:

I% = percentagem de inibição

SG_{amostra} = sementes germinadas nas placas onde se aplicaram os extratos

SG_{controle} = Sementes germinadas nas placas controle

O crescimento radicular foi medido utilizando papel milimetrado. A massa da matéria seca, ou seja, a biomassa da plântula foi obtida pela secagem a 70°C em estufa até massa constante (MIRÓ et al., 1998; PROCOPIO et al., 2005).

3.3 – Determinação por HPLC de Compostos Fenólicos em Extrato Aquoso de Sementes de Feijão-de-Porco (*Canavalia ensiformis*)

3.3.1 - Fracionamento Cromatográfico dos Extratos Aquosos

Devido aos prováveis interferentes, os extratos obtidos foram fracionados antes de proceder a sua determinação cromatográfica.

Para o fracionamento dos extratos aquosos, utilizaram-se sílica gel como fase estacionária e como solvente de eluição, n-hexano, hexano-benzeno (1:1, v/v), diclorometano, acetato de etila e metanol, de acordo com a Figura 5.

Figura 05 - Esquema do fracionamento cromatográfico em sílica gel (MELECCHI, 2005, com modificações)

O fracionamento foi realizado utilizando-se de uma bureta (45 cm x 11 mm) empacotada com 6,0 g de sílica gel previamente ativada (110°C), adicionou-se uma camada de sulfato de sódio anidro (2 g). O condicionamento da coluna foi realizado com 20 mL de hexano. Misturou-se 1,0 g de extrato seco com 2,0 g de sílica fazendo uma pasta usando quantidade suficiente de metanol (solvente no qual o extrato é solúvel). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, colocando o material no dessecador a vácuo, com sílica desidratante. Esse material foi colocado na parte superior da coluna (MATOS, 1997).

A coluna foi eluída com 40 mL dos respectivos eluentes, obtendo-se cinco frações. As respectivas frações hexano, hexano-benzeno (1:1, v/v), diclorometano foram concentradas em atmosfera de nitrogênio até aproximadamente 1 mL sendo armazenados em frascos vedados, em freezer para posterior determinação por HPLC. A fração metanol e acetato de etila foram reunidas e secas a vácuo, sendo posteriormente dissolvida em metanol e água para determinação por HPLC.

As massas obtidas a partir da extração aquosa de 250 g de material vegetal assim como o rendimento após fracionamento para a fração polar (Fração 4 + Fração 5) são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 03 – Massas dos extratos secos de sementes de *Canavalia ensiformis*

Massa seca do extrato bruto (g)	55,000 ± 4,999
Massa do extrato fracionado (g)	1,000 ± 0,098
Massa seca da fração polar após fracionamento (g)	0,157 ± 0,028

3.3.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Foram avaliadas as condições para determinação de compostos fenólicos no extrato aquoso de sementes de feijão-de-porco, empregando-se como fase estacionária uma coluna ODS (Octadecilsilica) e diferentes fases móveis: ACN (B)/HOAc (A) (2% em H₂O, pH 3,0), MeOH (B)/H₂O (A), ACN /MeOH/HOAc (88:10:2) (B)/H₂O (A), ACN (B)/HCOOH (A) (2% em H₂O, pH 3,0) nos modos de eluição isocrático e gradiente, em várias proporções.

Para seleção do melhor comprimento de onda, mediu-se a absorbância dos analitos na região de 200-800 nm. Os resultados podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 06 - Comprimentos de onda para absorção de luz UV/Vis para os analitos em estudo

As condições empregadas para análise dos extratos aquosos estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 04 – Condições empregadas para a determinação por HPLC de compostos fenólicos presentes em extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis*

Coluna	<i>STR ODS – II (150 x 4.6mm x 5µm)</i>
Temperatura da Coluna	33°C
Detector	UV-VIS Shimadzu SPD-10A, $\lambda = 255, 270$ e 330 nm
Fase Movei	A: HCOOH (2% em H ₂ O, pH 3,0) e B: ACN
Fluxo da Fase Móvel	0,8 mL/min
Programação do Gradiente	10-40% de B em 5 min
Volume da Amostra	Loop de 20 µL
Bomba	LC-10AD Shimadzu

Diante dos dados de comprimento de onda obtidos (Figura 6), selecionaram-se os comprimentos de onda, 255, 270 e 330 nm, ou seja, nos quais havia melhor absorção dos analitos em estudo. Assim, empregando as condições apresentadas na Tabela 4, obtiveram-se os cromatogramas para os padrões nos diferentes comprimentos de onda (Figura 7).

Figura 07 - Cromatograma dos padrões de compostos fenólicos nos comprimentos de onda 255, 270 e 330 nm: 1- ácido clorogênico, 2 – ácido ferúlico, 3 – rutina, 4 – naringina, 5 – ácido p-anísico, 6 – quercetina, 7 – genisteína, 8 – Caempferol

Diante dos cromatogramas obtidos nos diferentes comprimentos de onda (Figura 7), vê-se que o melhor comprimento de onda para análise do ácido clorogênico e do ácido ferúlico é a 330 nm, porém para a naringina e ácido p-anísico a análise fica comprometida. Portanto, a determinação dos extratos foi realizada nos três comprimentos de onda (255, 270 e 330 nm) para melhor avaliação dos analitos em estudo.

Os compostos fenólicos estudados neste trabalho foram escolhidos a partir do estudo realizado por Santos (2004) utilizando-se de folhas, raízes e sementes de feijão-de-porco e como técnica de determinação dos analitos eletroforese capilar.

3.3.3 – Determinação dos Limites de Detecção (LOD) e dos Limites de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos experimentalmente, através da análise da solução contendo padrões dos compostos fenólicos em diferentes concentrações.

Para tal, preparou-se uma solução padrão estoque, a partir de então fizeram-se diluições sucessivas. Analisaram-se os perfis dos cromatogramas a 255 nm e 330 nm obtidos para cada concentração. Cada ponto correspondeu à determinação em triplicata observando a variação na área em função da concentração para cada composto, assim como o tempo de retenção (tR).

O LOD e LOQ, que correspondem respectivamente à menor quantidade de um analito que pode ser detectada e à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada, foram calculados mediante definição IUPAC, utilizando as curvas analíticas obtidas para os compostos de interesse (LONG, 1983).

Os LOD e LOQ podem ser determinados segundo as expressões a seguir:

$$\text{LOD} = 3 \times \sigma/S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma/S$$

Onde: σ = Desvio padrão dos valores de Y no ponto de intercepto com a regressão linear.

S = coeficiente angular da curva analítica.

Resultados E Discussão

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação do Potencial Alelopático de Extratos Aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco)

Nas Figuras 8 e 9 apresenta-se o efeito alelopático dos extratos de sementes de feijão-de-porco no desenvolvimento de sementes de trapoeraba. Verifica-se que a curva de germinação para ambos os substratos apresenta similaridade. Há uma diminuição no número de sementes germinadas em relação ao tratamento controle, porém, verifica-se uma maior percentagem no número de sementes germinadas quando utilizado o solo como substrato. Independente da concentração do extrato, o pico de germinação, que representa o dia com maior número de sementes germinadas, ocorreu no mesmo tempo que para o pico do tratamento controle. Já considerando os substratos, tem-se que a tendência da curva de germinação em solo, em todos os tratamentos, foi semelhante à curva do tratamento controle, não sendo observado um efeito fitotóxico acentuado dos extratos. Em contrapartida, o efeito da concentração dos extratos aplicados em papel sobre a germinação, é muito mais aparente, sendo evidenciado um maior efeito fitotóxico.

Figura 08 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a germinação de sementes de trapoeraba (substrato solo).

Figura 09 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a germinação de sementes de trapoeraba (substrato papel)

Nas Figuras 10 e 11 são apresentados os efeitos dos extratos aquosos de sementes de feijão-de-porco sobre a germinação de sementes de corda-de-viola. Assim como para a trapoeraba, o efeito fitotóxico apresentou-se menos acentuado

quando aplicado extrato no solo. Na concentração 10 g L^{-1} em substrato solo, a germinação deu-se a partir do segundo dia, enquanto em substrato papel foi observada a partir do quinto dia.

Figura 10 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a germinação de sementes de corda-de-viola (substrato papel).

Figura 11 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a velocidade de germinação de sementes de corda-de-viola (substrato solo)

Na Figura 12, apresenta-se o efeito fitotóxico de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento de ambas as plantas daninhas, em ambos os substratos.

Figura 12 - Efeito fitotóxico do extrato de sementes de *Canavalia ensiformis* no desenvolvimento de sementes de trapoeraba e corda-de-viola (substrato solo e papel)

Considerando-se a Figura 12, observa-se que na presença de solo, a porcentagem de inibição na concentração 2 g L⁻¹ é diminuída para ambas as plantas daninhas, ou seja, há uma perda aparente do efeito alelopático. Nas concentrações 6 e 8 g L⁻¹ a porcentagem de inibição para a erva daninha trapoeraba ficou entre 50% e 52% quando aplicado em substrato solo e 68,2% e 72,7% em substrato papel, já para a erva daninha corda-de-viola a inibição foi de 17,4% em substrato solo e 13,1% e 30,1% em papel. Assim, os aleloquímicos presentes nas sementes de feijão-de-porco apresentaram ser mais eficientes na inibição da erva daninha trapoeraba.

Como visto nas Figuras 10 e 11, mesmo havendo atraso na germinação, a percentagem de inibição (Figura 12) para a corda de viola na concentração 10 g L^{-1} (substrato papel) foi menor do que em substrato solo.

Muitas vezes, o possível alelopático apenas retarda o processo germinativo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Portanto, outros parâmetros podem ser usados para interpretação do efeito alelopático, como: produção de biomassa e crescimento radicular, pois o efeito alelopático nem sempre é observado, por exemplo, sobre o percentual de germinação, mas sobre outros parâmetros do processo.

A massa seca da raiz ou parte aérea, bem como comprimento das plântulas ou radículas, são os parâmetros mais usados para avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Na Figura 13 é apresentado o efeito fitotóxico sobre a produção de biomassa das ervas daninhas trapoeraba e corda-de-viola. Observa-se que ao aplicar os extratos no solo, a produção de biomassa aumenta, o que possivelmente pode tratar-se de uma diminuição do efeito alelopático ou até mesmo do favorecimento ao desenvolvimento da plântula devido às características desse substrato. Fazendo-se a correlação simples entre as variáveis (solo e papel) para ambas as ervas daninhas, tem-se que é significativo ao nível de 5%. Foi aplicado o teste t ao nível de 5 e 1% utilizando-se do software ASSISTAT versão 7.4 beta (2007).

Figura 13 - Biomassa das plântulas de trapoeraba e corda-de-viola no ensaio alelopático com sementes de *Canavalia ensiformis* (substrato solo e papel).

A Figura 14 apresenta o crescimento radicular das ervas daninhas em estudo. Observa-se que para concentração 8 e 10 g L⁻¹, o efeito fitotóxico dos aleloquímicos sobre o crescimento radicular das plântulas das ervas daninhas trapoeraba e corda-de-viola foi mais acentuado.

Figura 14 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento radicular de sementes de corda-de-viola e trapoeraba usando como substrato papel de filtro e solo

Os efeitos inibidores dos aleloquímicos presentes neste extrato possivelmente quando liberados em solo podem ser diminuídos ou anulados devido a características físico-químicas e/ou biológicas do solo. Aplicando o teste t aos níveis de 5 e 1% tem-se que a diferença entre as variáveis solo e papel é significativa ao nível de 1% de probabilidade. Para realização do teste t utilizou-se do software ASSISTAT versão 7.4 beta (2007).

Com base nos resultados do comprimento radicular e a massa da matéria seca fica mais evidente o efeito alelopático dos extratos das sementes de feijão-de-porco (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Comparação do crescimento radicular de plântulas corda-de-viola utilizando extratos nas concentrações 0 e 10 g L⁻¹ (substrato papel).

Figura 16 - Comparação do crescimento radicular de plântulas corda-de-viola utilizando extratos nas concentrações 0 e 10 g L⁻¹ (substrato solo)

Diante dos resultados obtidos pode-se citar que possivelmente um dos fatores responsáveis pelos efeitos observados é a presença de microorganismos no solo, os quais podem estar degradando ou eliminando a fitotoxicidade de alguns aleloquímicos podendo, dessa forma, ser um dos responsáveis por essa ação (HEISEY, 1996). Em adição, a sorção entre os componentes do solo, tais como, argila ou matéria orgânica é relatada como fenômeno que provoca a diminuição da fitotoxicidade de compostos aleloquímicos, como exemplo, ácidos fenólicos (WANG⁵, 1978 apud HEISEY, 1996).

Em um estudo feito por Heisey (1996), sobre a persistência da fitotoxina ailanthona em solo esterilizado e não esterilizado, ele observou que em solo não esterilizado a fitotoxina ailanthona perde sua toxicidade em poucos dias, desaparecendo completamente, em contraste ao se utilizar o solo esterilizado. Neste, a fitotoxina permanece altamente tóxica por um longo período (HEISEY, 1996; 1990). Sendo assim, o menor efeito inibitório observado em solo pode estar relacionado à presença de microorganismos, uma vez que o solo não foi esterilizado.

Segundo Inderjit e Dakshini (1999), ao utilizar o solo como substrato, as forças de adsorção das micelas do solo podem exercer papel importante, como seqüestro dos possíveis aleloquímicos, levando a efeitos diversos. Em solos arenosos, por exemplo, há menor absorção que em solos coloidais e, neste caso, os aleloquímicos liberados são mais efetivos por ficarem livres na fase aquosa do solo (DAKSHINI *et al.*, 1999).

Woods⁶ (1960 apud MIRÓ *et al.*, 1998) relata que os microorganismos do solo podem transformar rapidamente os compostos liberados, levando-os a

⁵ WANG, T.S.C., *et al.*, Catalytic polymerization of phenolic compounds by clay mineral. **Soil Science**, v.126, p. 15-21, 1978.

⁶ WOODS, F.W. Biological antagonisms due the phytotoxic root exsudates. **The Botanical Review**, Bronx, v.26, p.546-569, 1960.

perder a atividade alelopática ou dar origem a compostos mais eficientes ligados à matriz do solo.

Assim, a atividade de alguns compostos alelopáticos está sujeita a diferentes fatores interferentes tais como: absorção pelos colóides, degradação, inativação e transformação por microrganismos (PRATES *et al.*, 2000). Portanto, ao utilizar substrato natural sem esterilização, deve-se assumir que há uma dinâmica de transformação dos compostos em solo difícil de ser acompanhada e reproduzir (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Pode-se salientar ainda, que por se tratar do substrato solo, este apresenta em sua composição condições favoráveis ao desenvolvimento das plântulas, como nutrientes, o que pode ser um dos fatores responsáveis pelas alterações observadas.

Para estudo do efeito alelopático de sementes de feijão-de-porco utilizou-se nos bioensaios sementes de ervas daninhas comumente encontradas em plantações de soja, assim fez-se necessário também um estudo do potencial alelopático do feijão-de-porco sobre as sementes de soja.

As Figuras 17 e 18 mostram que assim como para as ervas daninhas o extrato também afetou a velocidade de germinação das sementes de soja, sendo observado que aquelas semeadas em solo apresentaram protrusão radicular a partir do segundo dia, enquanto em papel a protrusão se deu a partir do quarto dia de semeadura. Não foi observada inibição da germinação para as sementes de soja, assim como o desenvolvimento das radículas (Figura 19) apresentou um perfil diferenciado das demais espécies em estudo, em que o crescimento radicular em substrato solo foi menor do que quando utilizado papel como substrato para

concentrações superiores a 4 g L⁻¹, o que difere das demais espécies em estudo, que ao utilizar solo como substrato houve decréscimo do efeito fitotóxico.

Figura 17 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a velocidade de germinação de sementes de soja (substrato papel)

Figura 18 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre a velocidade de germinação de sementes de soja (substrato solo)

Deve-se salientar que o inconveniente de se trabalhar com sementes de soja foi a grande proliferação de fungos, sendo necessário fazer a lavagem das sementes de soja com solução de hipoclorito de sódio 10%.

Figura 19 - Efeito fitotóxico de extratos de *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento radicular de sementes de soja usando como substrato papel de filtro e solo

Vale destacar que tanto para as ervas daninhas quanto para a soja, o fenômeno alelopático pode ser visualizado no aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da raiz o sintoma mais evidente. Esse sintoma apresentou-se bem evidente para todas as espécies em estudo, pois nas plântulas dos tratamentos controle não foi observada necrose das raízes, exceto das plântulas de soja.

4.1.2 – Estudo do Efeito Fitotóxico de Extrato de *Canavalia ensiformis* Após Fracionamento

Durante o fracionamento para posterior determinação por HPLC, observou-se a formação de uma turvação nas frações acetato de etila e metanol, com posterior floculação de coloração branca e a precipitação de sólido amarelo, sendo que este precipitado apresentou uma maior solubilidade na fração metanólica, assim resolveu-se fazer bioensaio utilizando-se do precipitado proveniente da junção das frações acetato de etila e metanol (F4 e F5).

Na Figura 20 apresenta-se o comportamento das sementes de plantas daninhas trapoeraba e corda-de-viola frente ao extrato proveniente das frações 4 e 5. Observa-se que efeito o fitotóxico foi mais ativo na inibição de sementes de trapoeraba (88,7%) do que para as sementes de corda-de-viola (17,4%). Este dado vem complementar os resultados apresentados anteriormente, em que os extratos apresentaram-se menos ativos para sementes de corda-de-viola do que para trapoeraba (Figura 21).

Figura 20 - Efeito fitotóxico da fração polar (frações 4 + 5) no desenvolvimento de sementes de corda-de-viola e trapoeraba (substrato papel)

Na Tabela 5 são dadas a biomassa obtida para as ervas daninhas trapoeraba e corda-de-viola, no ensaio alelopático realizado com a fração polar. Como visto, houve uma redução de 35,9% na produção de biomassa para a corda-de-viola em relação ao tratamento controle. Para a trapoeraba não foi possível determinar a biomassa produzida na Fração polar, pois a quantidade de matéria seca produzida não foi suficiente para a determinação.

Tabela 5 – Biomassa obtida no ensaio alelopático com a fração polar para as ervas daninhas trapoeraba e corda-de-viola

	Biomassa (g)	
	Trapoeraba	Corda-de-viola
Tratamento controle	0,0137	0,138
Fração polar	-	0,0884

Figura 21 - Efeito fitotóxico da fração polar (frações 4 + 5) no desenvolvimento de sementes de trapoeraba (substrato papel)

4.2 – Análises Cromatográficas por HPLC – UV-VIS

4.2.1 - Análises de Compostos Fenólicos Presentes em Sementes de *Canavalia ensiformis* por HPLC

Utilizando-se das duas técnicas, análise por comparação do tempo de retenção (t_R) dos analitos em estudo na solução padrão e a amostra, e adição de padrão buscou-se determinar a presença de compostos fenólicos em sementes de *Canavalia ensiformis*.

Durante o fracionamento, observou-se na fração acetato de etila a turvação à medida que a eluição prosseguia, sendo que ao fim da coleta da fração acetato de etila havia flocos de coloração branca e um precipitado de cor amarela não identificado (Figura 22).

Figura 22 - Frações obtidas através do fracionamento com hexano, hexano:benzeno (1:1), diclorometano, acetato de etila e metanol

As Frações (1, 2 e 3) obtidas, foram concentradas em fluxo de nitrogênio e posteriormente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo que nos extratos obtidos nas frações 1 e 2 (respectivamente, hexano e hexano/benzeno) não foi detectado nenhum pico.

A fração diclorometano como se pode ver (Figura 23), destacam-se os picos a e b, sendo a princípio acreditar que o pico a poderia tratar-se do ácido clorogênico, porém comparando os cromatogramas a 255, 270 e 330 nm, não é observado uma maior absorção para o mesmo a 330 nm o que experimentalmente seria esperado para o ácido clorogênico que apresentou o mesmo tempo de retenção (tR) , portanto possivelmente trata-se de outro composto. O pico b, no entanto, apresentou tempo de retenção (tR) dentro do esperado para a genisteína, porém não foi possível confirmar através do método da adição de padrão, pois a quantidade de amostra disponível para tal procedimento não foi suficiente. É importante salientar que essas duas substâncias foram determinadas por Santos (2004) nas frações metanólicas de sementes de *Canavalia ensiformis* utilizando-se de protocolos específicos para análise de ácidos fenólicos e flavonóide através da técnica eletroforese capilar (SANTOS, 2004).

Figura 23 - Cromatograma nos comprimentos de onda 255, 270 e 330 nm para a fração diclorometano de extrato de sementes de feijão-de-porco.

Baseado nesses critérios não foi possível certificar a presença da genisteína, assim como o ácido clorogênico na fração diclorometano.

Como na fração acetato de etila houve a formação de um precipitado, sendo o mesmo solúvel em metanol resolveu-se misturá-la à fração metanólica para análise como fração polar, porém antes fez-se a determinação por HPLC das Frações 4 e 5, individualmente. No caso da fração acetato de etila como havia precipitado, foi necessário o uso de ultra-som para dissolvê-lo. O perfil cromatográfico foi semelhante para ambas as frações, porém a intensidade dos picos apresentou-se muito baixa.

Os cromatogramas obtidos para a fração polar nos comprimentos de onda 255, 270 e 330 nm estão apresentados nas Figuras 24, 25 e 26.

Figura 24 - Cromatograma obtido a 255 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L^{-1} : 1 - ácido clorogênico, 2 - ácido ferúlico, 3 - rutina, 4 - naringina, 5 - ácido p-anísico, 6 - quercetina, 7 - genisteína, 8 - Caempferol

Figura 25 - Cromatograma obtido a 270 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L^{-1} : 1 - ácido clorogênico, 2 - ácido ferúlico, 3 - rutina, 4 - naringina, 5 - ácido p-anísico, 6 - quercetina, 7 - genisteína, 8 - Caempferol

Figura 26 - Cromatograma obtido a 330 nm para a amostra real e amostra dopada com padrões de compostos fenólicos a 10 mg L^{-1} : 1 - ácido clorogênico, 2 - ácido ferúlico, 3 - rutina, 4 - naringina, 5 - ácido p-anísico, 6 - quercetina, 7 - genisteína, 8 - Caempferol

Portanto, a análise em conjunto dos cromatogramas obtidos para a fração polar (junção da Fração 4 e 5) nos comprimentos de onda 255, 270 e 330 nm permitiu determinar os compostos ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína pela comparação de seus tempos de retenção (Tabela 6), pelo enriquecimento dos extratos com os padrões.

Tabela 06 - Tempo de retenção (tR) dos padrões de compostos fenólicos estudados e determinados no extrato de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

tR(min)		
Composto fenólico	Padrão	Extrato de <i>Canavalia ensiformis</i>
Ácido clorogênico	8,540 ± 0,043	8,616
Ácido ferúlico	20,904 ± 0,039	20,171
Rutina	21,782 ± 0,047	-
Naringina	25,939 ± 0,0614	-
Ácido p-anísico	27,093 ± 0,541	27,046
Quercetina	34,123 ± 0,088	-
Genisteína	38,841 ± 0,092	38,963
Caempferol	40,123 ± 0,093	-

4.2.2 – Análise Quantitativa de Compostos Fenólicos por HPLC-UV/Vis

Para a análise quantitativa dos compostos fenólicos foi utilizado o método do padrão externo. Obtiveram-se os cromatogramas correspondentes a cada uma das concentrações (0,5; 1,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 mg L⁻¹) para os padrões de ácido p-anísico e genisteína a 255 nm e para o ácido ferúlico e clorogênico a 330 nm (1,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 mg L⁻¹). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

As curvas analíticas obtidas foram lineares, apresentando o coeficiente de correlação (R²) superior a 0,9900, demonstrando linearidade com relação à resposta do detector no intervalo de concentração estudado (Figura 27).

Figura 27 - Curvas analíticas dos compostos fenólicos determinados nos comprimentos de onda (λ) 255 e 330 nm (A – ácido clorogênico e B – ácido ferúlico a 330 nm; C – p-anísico e D – genisteína a 255 nm)

O limite de detecção e quantificação, calculados segundo IUPAC (LONG, 1983), assim como as concentrações obtidas para o ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína estão relatados na Tabela 7.

Tabela 07 – Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os compostos fenólicos determinados

Composto fenólico	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Ácido clorogênico	0,0479	0,1597
Ácido ferúlico	0,0384	0,1280
Ácido p-anísico	0,0370	0,1233
Genisteína	0,1062	0,3539

As concentrações determinadas na fração polar para os compostos encontrados nos extratos aquosos obtidos das sementes de *Canavalia ensiformis* foram de 13,78 mg L⁻¹ para o ácido clorogênico, 3,75 mg L⁻¹ para o ácido ferúlico, 35,34 mg L⁻¹ para o ácido p-anísico, 7,83 mg L⁻¹ para a genisteína.

4.3 – Potencial Alelopático dos Compostos Determinados Sobre a Germinação de Plantas Daninhas

Prepararam-se soluções nas concentrações 10, 50 e 100 mg L⁻¹ contendo padrões dos compostos fenólicos determinados nos extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* a fim de realizar a investigação da atividade alelopática dos compostos fenólicos determinados. Nas Figuras 28 e 29 observam-se que os padrões dos compostos fenólicos apresentaram efeito inibidor mais acentuado para as sementes de erva daninha trapoeraba. Os índices de inibição nas concentrações 10, 50 e 100 mg L⁻¹ foram respectivamente de 16,7%, 58,3% e 83%. A erva daninha corda-de-viola apresentou respectivamente, índice de inibição de

13,3%, 36,7% e 50% nas concentrações 10, 50 e 100 mg L⁻¹. A produção de biomassa para a erva daninha trapoeraba foi seriamente afetada pela adição dos compostos fenólicos, havendo redução na produção de biomassa em relação ao tratamento controle de 81,2%, 85,6% e 94,3% respectivamente para as concentrações 10, 50 e 100 mg L⁻¹, enquanto que para corda-de-viola a redução da biomassa em relação ao tratamento controle foi de 36,4%, 50,4% e 61% respectivamente para as concentrações 10, 50 e 100 mg L⁻¹. De modo geral, as sementes de corda-de-viola aparentemente apresentaram-se menos sensíveis ao efeito fitotóxico dos aleloquímicos presentes nas sementes de *Canavalia ensiformis*.

Figura 28 - Efeito fitotóxico dos compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína) no desenvolvimento de sementes de corda-de-viola e trapoeraba (substrato papel)

Figura 29 - Biomassa das plântulas de trapoeraba e corda-de-viola no ensaio alelopático com padrões de compostos fenólicos determinados nas sementes de *Canavalia ensiformis* (substrato papel)

Diversos mecanismos têm sido utilizados para explicar como essas substâncias aleloquímicas afetam o desenvolvimento vegetal (HARBORNE, 1993). Porém, o fato de um mesmo composto influenciar várias funções biológicas e de que a mesma função pode ser influenciada por mais de um composto torna ainda mais difícil a afirmação sobre os processos envolvidos na atividade alelopática. Os resultados obtidos estão de acordo com citações que relatam o potencial alelopático de compostos derivados do ácido cinâmico (RICE, 1984).

Analisando os resultados em conjunto, nota-se que, de modo geral, todos os tratamentos produziram reduções nos parâmetros investigados, havendo, contudo, efeitos mais acentuados em alguns casos. Destes podem-se destacar: o crescimento radicular e a produção de biomassa, sendo estes significativamente afetados pelos aleloquímicos presentes no extrato de feijão-de-porco. A necrose das raízes, por exemplo, evidencia o efeito alelopático.

Chon et al. (2002) e Espindola et al. (2006) constataram que os ácidos hidrocinâmico, *p*-cumárico e trans-cinâmico provocam alterações morfológicas nas raízes de plântulas de alfafa e da espécie *Echinochloa crus-galli*, levando à redução do seu desenvolvimento.

Booker et al. (1992) verificaram que o ácido ferúlico afeta negativamente a absorção de nutrientes e as relações hídricas em plântulas de pepino. Einhellig (1996) relata a possibilidade de que combinações desses compostos em ecossistemas podem levar ao surgimento de interações sinérgicas, aumentando a inibição no desenvolvimento de espécies vegetais.

Estudo feito por Santos (2004) utilizando compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido *p*-anísico e genisteína), individualmente mostra que esses compostos apresentam atividades alelopáticas, porém o efeito é potencializado quando utilizado uma solução mista.

Conclusões

5 – CONCLUSÕES

Extratos de *Canavalia ensiformis*, quando submetidos a bioensaios alelopáticos utilizando-se solo como substrato, têm o efeito fitotóxico diminuído quando comparado ao bioensaio realizado tendo papel filtro como substrato. Esta investigação mostra que na presença de solo os compostos aleloquímicos presentes nesta leguminosa possivelmente diminuem sua atividade fitotóxica.

O estudo alelopático realizado com a espécie *Canavalia ensiformis*, apresentou resultados satisfatórios com relação ao efeito alelopático do extrato aquoso em concentrações iguais ou superiores a 6 g L⁻¹. Nessas condições, o crescimento radicular produzida foi afetada independente do substrato utilizado. O mesmo observou-se para os tratamentos realizados com sementes de soja, em concentração 10 g L⁻¹; as diferenças físico-químicas e biológicas entre os substratos não apresentaram influência no resultado, porém, independente da concentração aplicada não houve inibição da germinação de sementes de soja. Um fator que possivelmente pode ter influenciado nos resultados obtidos para as sementes de soja, foi o bioensaio ter sido realizado em placa de Petri, onde o espaço físico não é adequado para que as plântulas pudessem se desenvolver, fato este corroborado pelo tamanho das sementes de soja, que são maiores que as sementes das demais plantas daninhas empregadas neste estudo. Um outro fator seria a presença de fungos que proliferaram mesmo após tratamento com hipoclorito de sódio 10% e adição de nistatina 0,2%.

Os efeitos inibidores dos aleloquímicos presentes neste extrato possivelmente quando liberados em solo podem ser diminuídos devido a características físico-químicas e/ou biológicas do solo.

Pode-se concluir que dentre os metabólitos secundários responsáveis pela atividade alelopática observada nos extratos desta espécie estão os compostos fenólicos: ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína. Esses compostos apresentaram-se como fortes inibidores de germinação. Observou-se também que os compostos presentes no extrato de feijão-de-porco assim como os compostos fenólicos determinados apresentam certa especificidade com relação as espécies estudadas, sendo que as sementes de trapoeraba apresentaram-se mais sensíveis aos aleloquímicos estudados.

Obteve-se inibição de 88,7% para trapoeraba e 17,4% para corda-de-viola ao utilizar-se da Fração polar (10 g L^{-1}) e 83% e 50%, respectivamente para trapoeraba e corda-de-viola, quando aplicado os padrões dos compostos fenólicos determinados nesta fração na concentração de 100 mg L^{-1} .

Esses resultados vêm complementar o estudo feito por Santos (2004). Assim, concluímos com este trabalho que nas sementes de *Canavalia ensiformis* estão presentes compostos fenólicos, tais como ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-anísico e genisteína, todos com atividades aleloquímicas dentre outros não determinados.

A utilização da água como um solvente é um argumento em favor da extração de toxinas solúveis em água considerando o enfoque ecológico deste trabalho. Como trabalho futuro é importante a identificação desses aleloquímicos. Para tal, seria ideal a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS), assim como posteriormente realizar a determinação do modo de ação, e a adsorção e dessorção (sorção) desses compostos em solo, em escala de laboratório e de campo, assim como

também, avaliar a viabilidade econômica do uso de sementes de feijão de porco como fonte de bioerbicidas.

Referências Bibliográficas

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T.S.; SANTOS, J.R.; GARRUTI, D.S.; FEITOSA, T. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 129-137, 2000.

BOOKER, F.L.; BLUM, U.; FISCUS, E.L. Shortterm effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 649-655, 1992.

CASS, Q. B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p. (Série Apontamentos).

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003, 207p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para uma análise biológica, obtenção determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 48-71.

CELEGHINI, R. M. S. **Extração e análise cromatográfica (HPLC) de cumarinas em plantas medicinais brasileiras**. 1997. 151f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

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

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.179.

DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L.; INDERJIT. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 3-14.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-449, 1999.

DEGANI, A.L.G; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. n. 7, p. 21-25, 1998.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DIAGONE, C.A. **Desenvolvimento de métodos: cromatográfico (HPLC/DAD) e eletroforético (CZE/DAD) para a análise de flavonóides em “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Martius e *Maytenus aquifolium* Martius)**. 2003. 260f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

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

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

EINHELLIG, F.A. Na integrated view of allelochemicals amid multiple stress. In:INDERJIT; DAKSHINI, K.M.; FOY, C.L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 479-494.

EMBRAPA (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária): Cultivo do milho. Disponível em:

<<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/plantasdaninhas.htm>> Acesso em: 15 set. 2007.

ERASMO, E.A.L.; AZEVEDO, W.R.; SARMENTO, R.A.; CUNHA, A.M.; GARCIA, S.L.R. Potencial de espécies utilizadas como adubo verde no manejo integrado de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 337-342, 2004.

ESPINDOLA, J.A.A.; CARVALHO, G.J.A.; RODRIGUES, E.P.; CARVALHO, M.G.; LIMA, M.E.F.; SOUZA, S.R. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 53-60, 2006.

EVANS, W.C. **Trease & Evan`s pharmacognosy**. 13. ed. London: Baillière-Tindall, 1989. 832p.

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

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1993. 318p.

HEISEY, R.M. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 2, p. 192-200, 1996.

HEISEY, R.M. Allelopathy and herbicidal effects of extracts from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima*). **Journal of Botany**, v. 77, p. 662-670, 1990.

INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS. **Insetos e outros seres**: Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/interacao/metabolitos.htm>>. Acesso em: Março de 2008.

JACKSON, R. Chemical constituents of grapes. In: JACKSON, R. **Wine science**: principles and applications. London: Academic Press, 1994. p. 178-219.

JARDIM DE FLORES. **Alelopatia**: a defesa natural das plantas. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ESPECIAIS/A09alelopatia.html>>. Acesso em: 6 abr. 2007.

LANÇAS, F.M. Cromatografia em fase gasosa. São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LARA, W.H. Pesticidas. **Química Nova**, v.15, n. 2, p.161-166, 1992.

LONG, L.G.; WINWFORDE, J.D. Limit of detection: A closer at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712 a - 724a. 1983.

MALHEIROS, A., PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.(Eds). **Plantas medicinais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-521.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.). **Plantas medicinais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p. 147-193.

MARASCHIN-SILVA, F. **Extração aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia**. 2004. 87f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 547-555, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

MELECCHI, M.I.S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 197f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n.8, p.1261-1270, 1998.

MORAIS, M.L.L. **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** 1995. 94f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

OLIVEIRA, N.S.; MERCADANTE, M.O.; LOPES, P.S.N.; GOMES, I.A.C.; GUSMAO, E.; RIBEIRO, L.M. *Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e etanólico de jatobá do cerrado*. **Unimontes Científica**, v. 4, n. 2, 2002.

PAIVA, P.D.O. **Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura**. 1998. 86f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

PARVEZ, M. M.; TOMITA-YOKOTANI, K.; FUJII, Y.; KONISHI, T.; IWASHINA, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 631-635, 2004.

PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S., Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 425-430, 2003.

PINTO, A.C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato Aquoso de *Leucena* na Germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B., SILVA, A.A.; PIRES, F.R.; RIBEIRO, J.I.J.; SANTOS, E.A. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-Sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.

PRODUÇÃO de soja: Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/>>. Acesso em: 12 abr. 2006.

RADI, P.A.; TERRONES, E.G.H. Isolamento e identificação de produtos naturais obtidos de plantas com potencial atividade herbicida. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2005_2/a/isolamento.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2007.

RICE, E.L. **Allelopathy**. London: Academic Press. 1984. 422p.

RIVERA-VARGAS, L.I.; SCHMITTHENNER, A.F.; GRAHAM, T.L. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 851-857, 1993.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. **Allelopathy**: basic and applied aspects. London: Chapman & Hall, 1992. 480p.

ROBARDS, K., ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. **Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JUNIOR, S.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista Multiciência**: Campinas, Jul. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_07_7.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2007.

SABIO INSTITUTO BIOLOGICO. **Alelopatia**. Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/interacao/alelopatia.htm>>. Acesso em: 12 ag. 2007.

SANTOS, S. **Potencial Alelopático e Avaliação Sistemática de Compostos Secundários em Extratos Provenientes de *Canavalia Ensiformis* Utilizando Eletroforese Capilar**. 2004.185f. Tese (doutorado)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

SANTOS, S.; MORAIS, M. L.; SOUZA FILHO, A. P.; REZENDE, M. O. O. Allelopathic potential and systematic evaluation of organic extracts from *Canavalia ensiformis* leaves (Jack Beans). **Journal of Environmental Science Health**, v. B40, p.77-84, 2005.

SEIGLER, D. S. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 876-885, 1996.

SKOOG, A.D.; HOLLER, J.F.; NIEMAN, A.T. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 641-653.

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

SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 357-364, 2002.

TIBERTI, L.A. **Análise quantitativa (HPLC) de flavonóides em *Maytenus aquifolium martius* (Celastraceae)**. 1998. 84f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

UDEDIBIE, A.B.I.; CARLINI, C.R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds—A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, p. 95-106, 1998.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O Setor de Agroquímicos. **BNDES Setorial**, n. 24, p. 69-96, 2006.

WACH, A.; PYRZYŃSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, v.100, p. 699-704, 2007

WIKIPÉDIA. Feijão-de-porco. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Feij%C3%A3o-de-porco>>. Acesso em: 20 ag. 2007.

WOLFENDER, J. L.; RODRÍGUES, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 299-316, 1998.