

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Considerações sobre a química de *Brachiaria humidicola* e efeitos
alelopáticos sobre leguminosas tropicais**

Roberta Cristiane Ribeiro

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Considerações sobre a química de *Brachiaria humidicola* e efeitos
alelopáticos sobre leguminosas tropicais**

ROBERTA CRISTIANE RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

e Co-orientação do Professor
Dr. Higinio Marcos Lopes

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área de
Concentração em Bioquímica.

Seropédica, RJ
Setembro de 2012

581.19

R484c

T

Ribeiro, Roberta Cristiane, 1974-

Considerações sobre a química de
Brachiaria humidicola e efeitos
alelopáticos sobre leguminosas
tropicais / Roberta Cristiane Ribeiro
- 2012.

122 f.: il.

Orientador: Mário Geraldo de
Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química vegetal - Teses. 2.
Brachiaria decumbens - Análise -
Teses. 3. Agentes alelopáticos -
Teses. 4. Leguminosa - Composição -
Teses. I. Carvalho, Mário Geraldo
de, 1952-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Química. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

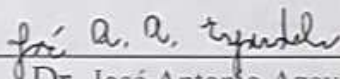
ROBERTA CRISTIANE RIBEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Bioquímica.

Tese Aprovada em 03 / 09 / 2012



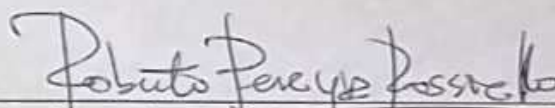
Dr. Mário Geraldo de Carvalho
ICE-UFRRJ (Orientador)



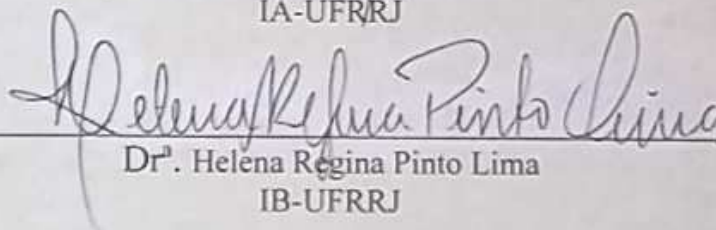
Dr. José Antonio Azevedo Espindola
CNPAB-EMBRAPA



Dr. Luiz Fernando Duarte de Moraes
CNPAB-EMBRAPA



Dr. Roberto Oscar Pereyra Rossiello
IA-UFRRJ



Dr. Helena Regina Pinto Lima
IB-UFRRJ

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Neide e Osvaldo, que sempre me apoiaram, incentivaram e
acreditaram em mim.
Ao meu grande amor, companheiro e amigo, Élio, obrigada por estar
ao meu lado em mais essa vitória.*

“Os homens semeiam na terra o que colherão na vida espiritual:
os frutos da sua coragem ou da sua fraqueza.”

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

Muito e a muitos eu tenho a agradecer pela conclusão desta importante etapa de minha vida, em especial a Deus pela oportunidade de aprender com tudo aquilo que vivenciei ao longo dessa jornada e por sempre iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais Neide Teruco Tolentino Ribeiro e Osvaldo Tolentino Ribeiro, os quais sempre se dedicaram na minha formação, pelo apoio nos momentos mais difíceis, obrigada por tudo.

Ao meu marido, amigo e companheiro Élio Barbieri Junior pela presença ao longo desta jornada. Obrigada por me ajudar a superar todas as dificuldades e aproveitar todos os momentos de alegria. Te amo muito.

Aos meus familiares que mesmo a distância sempre torceram por mim.

Ao professor e orientador Dr. Mário Geraldo de Carvalho pelos ensinamentos, paciência, oportunidade e confiança em mim.

Ao professor Dr. Roberto Oscar Pereyra Rossiello pela sua inestimável colaboração para a minha vida científica. O senhor é um exemplo que tento seguir. Este trabalho começou com o senhor.

Ao Professor e coorientador Higino Marcos Lopes pela experiência e apoio na execução deste trabalho.

Aos professores Marco Edilson Freire de Lima e Rosane Nora Castro pelo estímulo a trilhar este caminho.

A Professora Helena Regina Pinto Lima pelas valiosas sugestões passadas com muita serenidade.

Ao professor Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna pelo exemplo de profissional.

Ao professor Carlos Alberto Varella pelas longas discussões sobre estatística.

A Professora Maria de Lourdes pela vontade em executar minhas análises.

A professora Sonia Regina.

Aos professores de Bioquímica.

Aos professores Márcia Cristina Campos de Oliveira e Luciano Ramos Suzart por toda a experiência, conhecimento e amizade.

A técnica de laboratório e amiga Elania pelo trabalho em conjunto.

Aos técnicos e amigos Mauricio, Fábio, Carlão e Vitor que sempre estiveram a disposição para ajudar.

As bolsistas de iniciação científica Camila Figueiredo e Débora de Oliveira, pelo árduo trabalho.

Aos meus bolsistas e amigos do IFM *Campus Confresa*.

Aos amigos Natália Zatorre e Carlos Alberto Bucher pela amizade.

Aos amigos de Pós-Graduação Tereza, Queli, Ceará, Ana Paula, Pablo, Carlos, Daniele, Geraldo e Katarina.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Química pelo apoio, compreensão, aprendizado e convívio durante este período.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Instituto Federal do Mato Grosso.

Ao CNPq e FAPEMAT pelos recursos financeiros fornecidos para realização do projeto.

A construção da minha vida acadêmica tem a contribuição de todos que convivi durante a Graduação, Mestrado e agora o Doutorado. Mesmo aqueles com quem tive pouco contato me foram importantes. Portanto, eu agradeço a todos que fizeram parte dessa história. Obrigada a todos.

RESUMO GERAL

RIBEIRO, Roberta Cristiane. **Considerações sobre a fitoquímica de *Brachiaria humidicola* e efeitos alelopáticos sobre leguminosas tropicais.** 2012. 105p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O conhecimento do perfil alelopático pode melhorar o uso de espécies de gramíneas e leguminosas com pouca atividade alelopática entre si, podendo assim, resultar em um consórcio mais equilibrado e duradouro. Com base nesses aspectos, estruturou-se o presente trabalho, assumindo-se, como hipótese, que a *Brachiaria humidicola*, seus extratos, frações ou substâncias extraídas da gramínea possuem efeito alelopático sobre leguminosas tropicais (*Stylosanthes* spp., *Desmodium ovalifolium*, *Macrotyloma axillare*, *Calopogonio mucunoides* e *Cajanus cajan*). Para testar essa hipótese foram desenvolvidos experimentos em laboratório ou casa de vegetação, para demonstrar o efeito alelopático dessa gramínea, além de verificar, dentre as leguminosas avaliadas, a mais tolerante. Foram obtidos extratos brutos, frações e substâncias isoladas a partir de extração exaustiva e sucessiva a frio com solventes orgânicos. As amostras foram submetidas a diferentes técnicas de identificação de substâncias como a prospecção fitoquímica, utilização de RMN ^1H e ^{13}C , CG-EM e pela técnica de eletroforese capilar. Os componentes voláteis foram obtidos por hidrodestilação a partir de material vegetal fresco. Apesar da análise com prospecção química caracterizar apenas qualitativamente os metabólitos ou classes deles, esta técnica, aliada a RMN ^1H e ^{13}C orientaram a interpretação dos eventos biológicos que ocorreram nos bioensaios de germinação. Embora os ácidos cinâmicos e seus derivados não tenham sido identificados com precisão nas técnicas de prospecção e RMN, é provável que os efeitos inibitórios, observados estejam associados a eles. De acordo com os resultados da eletroforese capilar as menores concentrações de compostos fenólicos foram detectadas nos extratos aquosos de semente. Enquanto que a maior concentração foi encontrada no extrato metanólico da parte aérea. Para os extratos brutos da parte aérea, raiz e sementes, as leguminosas mais sensíveis foram *Stylosanthes* spp. seguindo de *C. mucunoides*. Já a mais tolerante foi a *M. axillare*. As amostras de saponinas obtidas das raízes de *B. humidicola* apresentaram elevada capacidade inibidora. Foi observada uma relação semelhante entre o controle e avaliações com flavonoides em *M. axillar*. O hidrolato e a água de decocção de partes de *B. humidicola* (raiz, parte aérea e semente) mostraram efeito inibitório sobre as espécies receptoras. Água de decocção, principalmente, obtida a partir da raiz, resultou em maior efeito inibitório. Em contraste, o hidrolato de semente mostrou menor atividade alelopática. Nos experimentos realizados em casa de vegetação, a presença de palha de *B. humidicola* no substrato de cultivo inibiu de modo intenso o crescimento e a produção de massa seca de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. Leituras de clorofila, em particular, a relação clorofila *a/b*, pode ser utilizada como índice do efeito alelopático de *B. humidicola* sobre a leguminosa *C. cajan*. A resposta positiva dos flavonoides frente a germinação de *L. sativa* e *M. axillare* mostra a tendência que estudos de melhoramento devem priorizar sobre gramíneas que favoreçam a biossíntese desse metabólito.

Palavras-chave: Alelopatia. Aleloquímico. *Cajanus cajan*. Consórcio de pastagem. Hidrodestilação. *Macrotyloma axillare*. Metabólitos especiais. *Stylosanthes* spp.

ABSTRACT

RIBEIRO, Roberta Cristiane. **Chemical considerations concerning *Brachiaria humidicola* and allelopathic effects of *Brachiaria humidicola* on tropical legumes.** 2012. 105p. Thesis (PhD in Chemistry). Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, 2012.

Knowledge of allelopathic profile can improve the use of species of grasses and legumes with low allelopathic activity among themselves, and may thus result in a more balanced and sustainable mixed pasture. Based on these aspects, was structured this work, assuming, hypothetically, that the *Brachiaria humidicola*, their extracts, fractions or substances extracted from grass have allelopathic effects on tropical legumes (*Stylosanthes* spp., *Desmodium ovalifolium*, *Macrotyloma axillare*, *Calopogonium mucunoides* and *Cajanus cajan*). To test this hypothesis experiments were developed in the laboratory or greenhouse, to demonstrate the allelopathic effect of this grass, besides verifying, among legumes evaluated, the more tolerant. We obtained crude extracts, fractions and compounds isolated from successive and exhaustive extraction with organic solvents cold. The samples were subjected to various techniques of identifying substances such as phytochemical, using RMN ^1H and ^{13}C , GC-MS and capillary electrophoresis technique. The volatile components were obtained by hydrodistillation from fresh plant material. Despite the exploration analysis with only qualitatively characterize chemical classes or their metabolites, this technique combined with RMN ^1H and ^{13}C guided interpretation of biological events occurring in the germination bioassays. Although cinnamic acids and their derivatives have not been precisely identified in prospecting techniques and RMN, it is likely that the inhibitory effects observed are associated with them. According to the results of capillary electrophoresis low concentration of phenolic compounds were detected in the aqueous extracts of seed. While the highest concentration was found in the methanol extract of shoot. For the crude extracts of the shoot, root and seeds, legumes *Stylosanthes* spp. were more sensitive following *C. mucunoides*. *M. axillare* was the most tolerant. Samples of saponins obtained from the roots of *B. humidicola* showed high inhibitory capacity. A similar relationship was observed between the control and evaluations with flavonoids in *M. axillare*. The hydrolate and water decoction parts of *B. humidicola* (root, shoot and seed) showed inhibitory effect on the receptor species. Water decoction, mainly from the roots, resulted in a greater inhibitory effect. In contrast, the seed hydrolate showed less activity. In contrast, the hidrolact seed showed less allelopathic activity. In experiments conducted in the greenhouse, the presence of straw *B. humidicola* the culture substrate inhibited so intense growth and dry matter production of *C. Cajan* and *Stylosanthes* spp. Readings of chlorophyll, in particular chlorophyll a/b can be used as an index of the effect of allelopathic *B. humidicola* on legume *C. cajan*. The positive response of flavonoids against germination *L. sativa* and *M. axillare* shows that the trend of improvement should prioritize studies on grasses that favor this metabolite biosynthesis.

Key words: Allelopathy. Allelochemistry. *Cajanus cajan*. Hydrodistillation. *Macrotyloma axillare*. Mixed tropical pastures. Specials metabolites. *Stylosanthes* spp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância do Gênero <i>Brachiaria</i> (Trin.) Griseb. e Alelopatia.....	3
2.1.1 Metabolismo secundário em plantas.....	5
2.1.2 Liberação dos metabólitos no meio ambiente.....	6
2.1.3 Obtenção e identificação de substâncias bioativas.....	8
2.1.4 Atividade alelopática do gênero <i>Brachiaria</i> (Trin.) Griseb.....	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	13
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE <i>Brachiaria humidicola</i> E EFEITO ALELOPÁTICO SOBRE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS RECOMENDADAS PARA CONSÓRCIO DE PASTAGEM	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Local de Coleta.....	27
2.2 Coleta e Processamento do Material Vegetal.....	28
2.3 Prospecção Química e Análise com Ressonância Magnética Nuclear.....	29
2.4 Eletroforese Capilar (EC)	30
2.4.1 Instrumentação e reagentes para EC.....	30
2.4.2 Procedimentos analíticos para EC.....	30
2.4.3 Preparo das amostras para EC.....	31
2.5 Procedimentos de Fracionamento dos Extratos Brutos Metanólicos da Raiz e da Parte Aérea de <i>B. humidicola</i>	31
2.6 Bioensaio de Atividade Alelopática.....	32
2.6.1 Espécies receptoras.....	32
2.6.2 Extratos brutos, frações e padrões para teste de atividade alelopática.....	32
2.6.3 Bioensaio de germinação.....	35
2.7 Análises Estatísticas.....	37
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	38
3.1 Identificação das Classes de Metabólitos Especiais nos Extratos Brutos.....	38
3.1.1 Análise dos extratos brutos da parte aérea de <i>B. humidicola</i>	38
3.1.2 Análise dos extratos brutos da raiz de <i>B. humidicola</i>	39
3.1.3 Análise dos extratos brutos da semente de <i>B. humidicola</i>	42
3.2 Estudo das Frações Obtidas do Extrato Bruto Metanólico da Parte Aérea.....	43
3.3 Eletroforese Capilar.....	44
3.4 Bioensaios de Atividade Alelopática de Extratos Brutos de <i>B. humidicola</i>	48
3.4.1 Extrato bruto da parte aérea.....	48
3.4.2 Extrato bruto da raiz.....	50
3.4.3 Extrato bruto da Semente.....	52
3.5 Frações do Extrato Bruto Metanólico da Parte Aérea e da Raiz.....	54
3.6 Substâncias Puras.....	56
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
6. ANEXOS	69

CAPÍTULO II- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA ÁGUA DE DECOCCÃO E HIDROLATO DE <i>Brachiaria humidicola</i> SOBRE A GERMINAÇÃO DE QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS TROPICAIS.....	74
RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	80
3.1 Atividade Alelopática da Parte Aérea.	80
3.2 Atividade Alelopática de Raiz.....	81
3.3 Atividade Alelopática de Semente.....	82
4. CONCLUSÕES.....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA PALHA DE <i>Brachiaria humidicola</i> NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, ESTRUTURAIS E PRODUTIVAS DE <i>Cajanus cajan</i> E <i>Stylosanthes</i> spp.....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	95
4. CONCLUSÕES.....	102
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Peso do extrato bruto de raiz, parte aérea e sementes de *B. humidicola*, após extração, concentração e secagem..... 29
- Tabela 2.** Métodos de quebra de dormência, temperatura de incubação e duração do fotoperíodo para os bioensaios de alelopatia com alface (*L.sativa*) e quatro leguminosas tropicais, sob a aplicação de extratos brutos de *B. humidicola*..... 37
- Tabela 3.** Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da parte aérea (F) de *B. humidicola*..... 39
- Tabela 4.** Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da raiz (R) de *B. humidicola*..... 40
- Tabela 5.** Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da semente (S) de *B. humidicola*..... 42
- Tabela 6.** Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) das frações obtidas a partir do extrato bruto metanólico da parte aérea (F) de *B. humidicola*..... 44

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Métodos de quebra de dormência, temperatura de incubação e duração do fotoperíodo para os bioensaios de alelopatia em alface (*L. sativa*) e quatro leguminosas forrageiras tropicais..... 79

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Resultados da análise da fertilidade do solo utilizado como substrato de crescimento durante o experimento. Amostragem em Setembro de 2011..... 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquemática simplificada da rota de biossíntese de metabólitos secundários. PEP: fosfoenolpiruvato; 3-PGA: 3- fosfoglicerato; MEP: Rota do metileritritol fosfato. Fonte: Modificado de Taiz & Zeiger (2009).....	6
Figura 2.	Rota de liberação dos aleloquímicos da planta para o ambiente. Fonte: Modificado de Yamamoto (2009).....	7
Figura 3.	Estrutura química do ácido acotínico. Fonte: Voll et al., 2004.....	10
Figura 4.	Estrutura das substâncias friedelina e epifriedelinol. Fonte: Santos et al. (2008).....	10
Figura 5.	Estrutura da brachiolactona. Fonte: Subbarao et al. (2009).....	12

CAPÍTULO I

Figura 1.	Local de coleta de <i>B. humidicola</i> . Fonte: Ribeiro (2006).....	27
Figura 2.	Fluxograma do material e métodos para obtenção dos extratos brutos de <i>Brachiaria humidicola</i> . 1: fração em acetato de etila= flavonoides; 2: sitosterol, estigmasterol e ácido graxo; 3: fração em hexano=ácidos graxos, triglicerídeos e flavonóide glicosilado; fração em diclorometano= sitosterol e terpenos; fração em acetato de etila= flavonoides e saponina com um grupo glicosídeo; 4: triglicerídeo e éster graxo; 5: fração em acetato de etila= alantoína.....	29
Figura 3.	Esquema de fracionamento com solventes orgânicos com polaridades crescentes dos extratos brutos metanólicos de raiz e parte aérea de <i>B. humidicola</i>	32
Figura 4.	Esquema das espécies e soluções testadas por espécie. Extrato Bruto de Raiz= R; Parte Aérea= F; Sementes= S; Frações de Hexano=H; Diclorometano= D; Acetato de Etila= A; Butanol= B e Resíduo= R.....	34
Figura 5.	Ácido cinâmico e seus derivados. H= Hidrogênio; OH= Hidroxila; OMe= Metoxila.....	34
Figura 6.	Ácido benzóico e seus derivados. H= Hidrogênio; OH= Hidroxila; OMe= Metoxila.....	35
Figura 7.	Flavonoide e seus derivados. Gli= Glicose; Ram= Ramnose.....	35
Figura 8.	Germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) no terceiro dia de avaliação (tratamento à esquerda controle e à direita BSHS).....	36
Figura 9.	Estigmasterol Δ^{22-23} ; sitosterol 22-23diidro detectados no extrato bruto hexânico após purificação.....	40
Figura 10.	<i>E</i> -3-hidroxi-1-(3,4dihidroxifenil)-propeno identificado na fração de diclorometano de extrato bruto metanólico da raiz.....	41
Figura 11.	Esqueletos básicos de metabólitos identificados por RMN e em frações obtidas com acetato de etila a partir do extrato metanólico da raiz de <i>B. humidicola</i>	41
Figura 12.	Esqueletos básicos de metabólitos identificados por RMN no extrato de semente de <i>B. humidicola</i>	43
Figura 13.	5, 7, 3', 4'-tetrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona detectado e determinado por RMN a partir das subfrações de acetato de etila	

	oriundo do extrato metanólico da parte aérea de <i>B. humidicola</i> , Anexos 4 e 5	44
Figura 14.	Eletoferogramas dos extratos brutos de parte aérea de <i>B. humidicola</i> . Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); brach= extrato bruto da parte aérea; 4= Metanol/Água; 5= Metanol e 9= Água.....	45
Figura 15.	Eletoferogramas dos extratos brutos hexânicos de <i>B. humidicola</i> . Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de <i>B. humidicola</i> ; R= Raiz; F= Parte Aérea; S= semente e H= Hexano. O círculo vermelho destaca os sinais dos padrões (fenólicos) e os sinais similares nas amostras de <i>B. humidicola</i>	46
Figura 16.	Eletoferogramas das frações obtidas do extrato bruto metanólico da parte aérea de <i>B. humidicola</i> . Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BHFM= Extrato da parte aérea de <i>B. humidicola</i> Fração Metanólica; Ac= Acetato de etila; H= Hexano e B= Butanol. O círculo vermelho destaca os sinais dos padrões (fenólicos) e os sinais similares nas amostras de <i>B. humidicola</i>	46
Figura 17.	Espectro de RMN demonstrando os sinais característicos da presença de flavonoides na fração butanólica do extrato metanólico da parte aérea de <i>B. humidicola</i>	47
Figura 18.	Atividade alelopática de extratos brutos de parte aérea de <i>Brachiaria humidicola</i> sobre sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface). BH= <i>B. humidicola</i> ; F= Parte aérea; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	48
Figura 19.	Atividade alelopática de extratos brutos de parte aérea de <i>B. humidicola</i> sobre sementes de leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) <i>Stylosanthes</i> spp.; B) <i>Macrotyloma axillare</i> ; C) <i>Calopogonio mucunoides</i> e em D) <i>Desmodium ovalifolium</i> . BH= <i>B. humidicola</i> ; F= Parte aérea; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	49
Figura 20.	Atividade alelopática de extratos brutos de raízes de <i>Brachiaria humidicola</i> sobre sementes de <i>L. sativa</i> (alface). BH= <i>B. humidicola</i> ; R= Raiz; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	51
Figura 21.	Atividade alelopática de extratos brutos de raízes de <i>B. humidicola</i> sobre sementes de leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) <i>Stylosanthes</i> spp.; B) <i>Macrotyloma axillare</i> ; C) <i>Calopogonio mucunoides</i> e em D) <i>Desmodium ovalifolium</i> . BH= <i>B. humidicola</i> ; R= Raiz; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	52
Figura 22.	Atividade alelopática de extratos brutos das sementes de <i>Brachiaria humidicola</i> sobre sementes de <i>L. sativa</i> (alface). BH= <i>B. humidicola</i> ; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água.	

	Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	53
Figura 23.	Atividade alelopática de extratos brutos das sementes de <i>B. humidicola</i> sobre leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) <i>Stylosanthes</i> spp.; B) <i>Macrotyloma axillare</i> ; C) <i>Calopogonio mucunoides</i> e em D) <i>Desmodium ovalifolium</i> . BH= <i>B. humidicola</i> ; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	54
Figura 24.	Atividade alelopática de cinco frações obtidas do extrato bruto metanólico da parte aérea de <i>B. humidicola</i> sobre sementes de <i>L. sativa</i> e duas leguminosas forrageiras. BHFM= extrato bruto em metanol da parte aérea; Fração H= Hexano, D= Diclorometano, A= Acetato de etila, B= Butanol e R= Resíduo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	55
Figura 25.	Atividade alelopática de cinco frações obtidas do extrato bruto metanólico da raiz de <i>B. humidicola</i> sobre sementes de <i>L. sativa</i> e duas leguminosas forrageiras. BHFM= extrato bruto em metanol da parte aérea; Fração H= Hexano, D= Diclorometano, A= Acetato de etila, B= Butanol e R= Resíduo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	56
Figura 26.	Atividade alelopática das soluções: i) um composto fenólico, o ácido <i>trans</i> -cinâmico (ATC); ii) um mix de quatro flavonoides (MF: Rutina, Canferol, Canferol 3'-a-ranminosideo e Quercetina) e iii) MF+ATC, sobre <i>L. sativa</i> e na leguminosa <i>M. axillare</i> . Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	57
Figura 27.	Atividade alelopática de derivados dos ácidos cinâmicos (a forma <i>trans</i> do ác. cinâmico, ác. <i>p</i> -cumárico, ác. ferúlico, ác. cafeico e ác. sinápico) e dos ácidos benzoicos (ác. <i>p</i> -hidroxibenzóico, ác. gálico, ác. protocatequico, ác. vanílico) sobre as espécies receptoras <i>L. sativa</i> e <i>M. axillare</i> . Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	58
Figura 28.	Atividade alelopática de <i>L. sativa</i> e <i>M. axillare</i> sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de <i>B. humidicola</i> e a hesperidina, flavonoide analítico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	59
Figura 29.	Efeito no desenvolvimento (comprimento de radícula e hipocótilo) de <i>L. sativa</i> e <i>M. axillare</i> sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de <i>B. humidicola</i> e a hesperidina, flavonoide analítico. A) Comprimento de radícula (cm) e B) Comprimento do hipocótilo (cm). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	61
Figura 30.	Massa seca (g) de plântulas normais <i>L. sativa</i> e <i>M. axillare</i> sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de <i>B. humidicola</i> e a hesperidina, flavonoide analítico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey	

	(p>0,05).....	62
Anexo 1.	Eletróferogramas dos extratos brutos de semente de <i>B. humidicola</i> . Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de <i>B. humidicola</i> ; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol Água e A= Água.....	69
Anexo 2.	Eletróferogramas dos extratos brutos de Raiz de <i>B. humidicola</i> . Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de <i>B. humidicola</i> ; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol Água e A= Água.....	69
Anexo 3.	Espectro de extrato metanólico da parte aérea de <i>Brachiaria humidicola</i>	70
Anexo 4.	RMN ¹ H do 5,7,3',4'-tretrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona.....	70
Anexo 5.	Espectro da fração acetato de etila do extrato metanólico de folhas de <i>Brachiaria humidicola</i> ; contendo mistura de ramnosil-flavonoides, e prováveis derivados cinâmicos e outros glicosídeos aromáticos.....	71
Anexo 6 a e b.	Espectro confirmando a presença de ácidos graxos e triglicerídeos em sementes de <i>Brachiaria humidicola</i>	72
Anexo 7.	Espectro da fração acetato de etila de raízes de <i>Brachiaria humidicola</i> confirmando derivados do ácido cinâmico (ac. cumárico) em raízes da planta.....	73
Anexo 8.	Espectro da fração acetato de etila da partição do extrato metanólico de etila de raízes de <i>Brachiaria humidicola</i> confirmando a presença de saponinas (S1 e S2) na planta.....	73

CAPÍTULO II

Figura 1.	Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da parte aérea de <i>B. humidicola</i> , o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas (p≤0,05) das médias entre as espécies receptores. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.....	81
Figura 2.	Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da raiz de <i>B. humidicola</i> , o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas (p≤0,05) das médias entre as espécies de receptores. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.....	82
Figura 3.	Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da semente de <i>B. humidicola</i> , o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas (p≤0,05) das médias entre as espécies de receptores. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.....	83

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Mapa indicando a localização da cidade de Confresa, na região nordeste do estado do Mato Grosso.. Fonte: Confederação Nacional de Municípios, 2011..... 92
- Figura 2.** Aspecto geral do desenvolvimento inicial da leguminosa *Cajanus cajan* nos diferentes tratamentos de inclusão da palha da parte aérea (%) de *B. humidicola*. Imagens obtidas aos 42 dias após o transplante..... 95
- Figura 3.** Diferença geral observadas no desenvolvimento inicial da leguminosa *Stylosanthes* spp. nos diferentes tratamentos de inclusão da palha da parte aérea (%) de *B. humidicola*. Imagem obtida aos 42 dias após o transplante..... 95
- Figura 4.** Altura de plantas de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B) em função da idade e porcentagem de inclusão de *B. humidicola*..... 96
- Figura 5.** Número de folhas por planta de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B) em função da idade e porcentagem de inclusão de *B. humidicola*..... 96
- Figura 6.** Teores de clorofila observados para a leguminosa *Stylosanthes* spp. cultivada sem a inclusão de palha de *B. humidicola* no substrato. Letras minúsculas iguais não diferem entre si na mesma semana de cultivo. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si para a mesma variável entre épocas de amostragem (semanas)..... 97
- Figura 7.** Valores médios e desvios padrão observados nas leituras de índice de clorofila total ($a+b$) para a leguminosa *C. cajan*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 98
- Figura 8.** Valores médios e desvios padrão observados nas leituras de índice de clorofila a (A) e b (B) para a leguminosa *C. cajan*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 98
- Figura 9.** Variação na relação clorofila a/b para a leguminosa *C. cajan*. em função das diferentes inclusões de palha de *B. humidicola*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 99
- Figura 10.** Mortalidade média da leguminosa *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B). observada ao final do período experimental. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)..... 99
- Figura 11.** Produção de Massa fresca de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* (B) submetido a níveis de inclusão de *B. humidicola*. Amostragem realizada após 72 dias de cultivo. Letras iguais não diferem entre si

	pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	100
Figura 12.	Produção de Massa seca de <i>C. cajan</i> (A) e <i>Stylosanthes</i> (B) submetido a níveis de inclusão de <i>B. humidicola</i> . Amostragem realizada após 72 dias de cultivo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, os sistemas de produção de leite e carne bovina são baseados quase que exclusivamente em pastagem nativa e cultivada, no qual são tidas como a principal fonte de alimentação de ruminantes (BERNARDI et al., 2012), devido ao seu baixo custo de produção (EUCLIDES et al., 2010; SKONIESKI et al., 2011).

Na região tropical, as pastagens cultivadas são dominadas principalmente por gramíneas africanas do gênero *Brachiaria* (MACEDO et al., 2010). Entre elas, as espécies *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola* ocupam milhões de hectares, especialmente no Brasil Central (MACEDO et al., 2010). A espécie *B. humidicola* (Rendle) Schweick é bastante difundida nos trópicos úmidos da América do Sul (BRITO et al., 2004) devido entre outras, as características como: a tolerância a condições extremas de solos com deficiência hídrica ou mal drenados (GENNI et al., 2004); a associação a fungos micorrízicos (RAO et al., 1996), processo que provavelmente propicia sua adaptação a solos com deficiência em fósforo disponível (SIQUEIRA & MOREIRA, 1997); a tolerância a níveis potencialmente tóxicos de alumínio no solo (WENZL et al., 2001); tolerância ao fogo e ao ataque das cigarrinhas-das-pastagens (DIAS FILHO, 1983). Além disso, pastos formados com *B. humidicola* são mais densos, devido ao seu hábito de crescimento, protegendo o solo contra a erosão (ROCHE et al., 1990; PERON & EVANGELISTA, 2003). Estas características fazem de plantas da espécie *B. humidicola* tenham um importante papel ecológico dentro do sistema de pastagens.

Outra característica importante que vem sendo foco de estudo dessa espécie é a sua capacidade de liberar substâncias químicas a partir de raízes que inibem a nitrificação do solo (SUBBARAO et al., 2006b; SUBBARAO et al., 2007a; SUBBARAO et al., 2009; FERNANDES et al., 2011).

Apesar da boa adaptabilidade demonstrada por estas pastagens, há, ao longo dos anos, um processo de declínio em sua produtividade. A degradação das pastagens é o nome dado a este processo, que é a principal causa da baixa produtividade no setor pecuário brasileiro (BERNARDI, et al., 2012). Estima-se que pelo menos metade das pastagens cultivadas são degradadas ou estão em processo de degradação (BODDEY et al., 2004). Estudos indicam que os dois principais impulsionadores do processo de degradação são a baixa fertilidade do solo (especialmente baixo teor de N no solo) e o superpastejo (ROSSIELLO & ANTUNES, 2012).

A introdução de leguminosas forrageiras em pastagens com monocultura de gramínea pode ser uma alternativa para melhorar a fertilidade dos solos tropicais (ALENCAR et al., 2012), além de enriquecer a dieta dos animais e, conseqüentemente, aumentar a produtividade das pastagens (MACEDO et al., 2010). No entanto, o uso de leguminosas, sob a forma de pastagens consorciadas continua com pouca expressividade (BARCELLOS et al., 2008). Algumas razões podem justificar esse fato, incluindo tentativas fracassadas no passado. Embora o uso de pastagens consorciadas de gramíneas e leguminosas tenha muitos atrativos, o baixo uso dessa tecnologia é devido principalmente ao estabelecimento lento e à baixa persistência das leguminosas em pastagem tropicais (BARCELLOS et al., 2008). Isso geralmente ocorre devido a fatores de concorrência, uma vez que a relação entre gramínea (C₄) e leguminosa (C₃) envolvem duas espécies com características morfofisiológicas distintas (RAO, et al., 1995), com taxas diferenciadas de crescimento. As gramíneas são mais eficientes do que as leguminosas em relação à fotossíntese, o que as torna mais competitivas dentro de pastagens consorciadas. Fatores bióticos também podem afetar o estabelecimento e persistência de plantas em consórcio, como o fenômeno conhecido como alelopatia (RICE,

1984; SMITH, 1989). Apesar de muitas discussões a respeito da definição, entende-se por alelopatia como sendo os efeitos prejudiciais ou benéficos de espécies de uma planta (doadora) na germinação e desenvolvimento de outras espécies (receptoras) dentro de uma comunidade vegetal (BHADORIA, 2011; JACOB & SARADA, 2012). A relação de alelopatia entre as espécies é obtida por interações de metabolitos da planta doadora em detrimento das espécies receptoras. Os chamados aleloquímicos são liberados no ambiente principalmente através de processos de exsudação, lixiviação, volatilização e decomposição do material vegetal (KHANH et al., 2005; XUAN, et al., 2005; WESTON et al., 2012). Neste contexto, o conhecimento das interações alelopáticas entre espécies de plantas podem contribuir para a compreensão de relações de gramíneas e leguminosas em pastagens consorciadas (SOUZA-FILHO, et al., 1997). Para isso se faz necessário realizar estudos que gerem conhecimento para a identificação de substâncias presentes em gramíneas forrageiras para o aperfeiçoamento do consórcio de pastagem. Por outro lado, a identificação de leguminosas de interesse agropecuário que tenham menor sensibilidade às substâncias fitotóxicas dessas gramíneas é de grande relevância, por propiciar informações que levem a um manejo adequado dessas plantas (WARDLE, 1987). Embora a literatura registre uma grande quantidade de estudos sobre a alelopatia com várias espécies, não são muitos os que tratam das relações de *B. humidicola* com leguminosas tropicais.

Com base na hipótese de que a *B. humidicola* produz em seu metabolismo secundário substâncias que inibem a germinação de leguminosas forrageiras tropicais, objetivou-se: *a*) Realizar a prospecção fitoquímica e a identificação de substâncias bioativas em extratos obtidos de diferentes partes de *B. humidicola* através de metodologias complementares; *b*) Realizar a avaliação da atividade alelopática de extratos, frações e substâncias purificadas sobre a germinação e o desenvolvimento da radícula de leguminosas forrageiras tropicais; *c*) Avaliar o efeito alelopático do hidrolato e da água de decocção obtida de diferentes partes de *B. humidicola* sobre a germinação de leguminosas forrageiras tropicais, assim como da *Lactuca sativa* (planta padrão em estudos alelopáticos); *d*) Avaliar o efeito níveis de inclusão da palha de *B. humidicola* no substrato de cultivo durante o desenvolvimento inicial de leguminosas forrageiras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nas plantas ocorre o metabolismo secundário, que dependendo da situação pode ser potencializado, principalmente por condições adversas, podendo funcionar como uma ferramenta de defesa e de perpetuação da espécie. As pesquisas relacionadas aos produtos desse metabolismo têm sido desenvolvidas durante décadas (RICE, 1984; SOUZA FILHO & ALVES, 1998) e continuam atualmente, em estudos que vão desde a caracterização e determinação da estrutura de substâncias elaboradas pela planta até as respostas biológicas a esses metabólitos (SOUZA-FILHO & ALVES, 1998; SOUZA-FILHO, 2006; BHADORIA, 2011; WESTON et al., 2012; REJILA et al., 2012).

Muitos estudos avaliam as interações químicas existentes entre espécies forrageiras e plantas invasoras espontâneas (MARTINS et al., 2006; BHADORIA, 2011); no entanto, a influência exercida por gramíneas sobre leguminosas tanto forrageiras como de adubação verde, é encontrada em menor número.

A informação a esse respeito é de extrema relevância, uma vez que pode indicar as espécies compatíveis ao consórcio de pastagens, sendo esses efeitos importantes principalmente durante o estabelecimento da leguminosa na pastagem (RICE, 1984; RODRIGUES et al., 1992; RIDENOUR & CALLAWAY, 2001; CALLAWAY, 2002).

2.1 Importância do Gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. e Alelopatia

Não é novidade dizer que a produção de ruminantes, nos trópicos, é dependente, quase exclusivamente, das pastagens (ZIMMER & EUCLIDES, 2000; BERNARDI et al., 2012). No Brasil, as gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* respondem como importante fonte na alimentação animal. Quase a metade da área ocupada por pastagens corresponde a monoculturas de gramíneas melhoradas, principalmente espécies desse gênero e nas regiões onde predomina a bovinocultura de corte. O gênero *Brachiaria* foi primeiramente descrito e classificado como uma subdivisão do gênero *Panicum*, por Trinius em 1934, sendo considerado um gênero apenas 19 anos mais tarde, por Grisebach em 1853 (VALLE et al., 2010). A classificação taxonômica é ainda assunto de discussão entre os especialistas da área, no entanto, o gênero *Brachiaria* é atualmente conhecido taxonomicamente como *Urochloa* (SILVA, 2000).

Dentro do gênero *Brachiaria*, sete espécies são bastante empregadas como recurso forrageiro na América Tropical (KELLER-GREIN et al., 1996; VALLE, et al., 2010); são elas *B. arrecta* (Hack.) Stent, *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *B. decumbens* Stapf, *B. dictyoneura* Stapf, *B. humidicola* (Rendie) Schweickerdt, *B. mutica* (Forsk) Stapf e *B. ruziziensis* R. Germ. & Evrard. Dentre estas, as mais utilizadas no Brasil estão a *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola*; cada uma delas com exigências nutricionais diferenciadas, não somente devido aos fatores genotípicos e de fenologia, mas pela interação destes com os fatores de solo, clima e sistema de manejo adotado (FERRAZ, 2003; PERON & EVANGELISTA, 2004). Apesar da boa adaptabilidade mostrada por esse gênero, evidenciada pelo elevado vigor e alta produção de fitomassa nos primeiros anos de implantação, observa-se, com o passar dos anos, um processo de declínio da produtividade vegetal. Degradação das pastagens é o nome dado ao processo (PERON & EVANGELISTA, 2004), sendo um indicativo de que o atual manejo dessas pastagens não é sustentável (OLIVEIRA, 2000). Embora não exista ainda consenso sobre as razões causais da degradação, sabe-se que o mesmo encontra-se associado, entre outros, a fatores como manejo inadequado, excesso de lotação e a não adoção de práticas conservacionistas da sustentabilidade das pastagens, especialmente a não reposição dos nutrientes extraídos do

sistema (BODDEY et al., 1993; ZIMMER & CORREA, 1999). Urquiaga et al. (1998) sugeriram que o declínio da produtividade das pastagens após alguns anos pode resultar de uma ciclagem muito lenta de uma grande fração da massa radicular, conduzindo à conservação ou acumulação de carbono no solo, mas, em contrapartida, aumentando a imobilização do N mineral e reduzindo drasticamente a sua disponibilidade para as plantas forrageiras. Em relação a este último aspecto, Werner (1984) e Fernandes & Rossiello (1986) apontaram a baixa disponibilidade de N no solo como uma das principais causas da degradação das pastagens, o qual têm ensejado recomendações de adubação deste nutriente tendentes a aumentar a oferta de nutrientes disponíveis às pastagens (RUSSELLE et al., 1992; CANTARUTTI et al., 2002; VIANA et al., 2011).

O aumento dos níveis do N mineral disponível às plantas pode ser obtido através de fontes químicas ou biológicas. Embora o N oriundo de cada uma dessas fontes tenha o mesmo valor biológico do ponto de vista da nutrição das forrageiras (JARVIS et al., 1995), a utilização das formas químicas do N, principalmente sob a forma de adubos industriais nitrogenados, sofre restrições, em primeiro lugar, econômicas. Estas se ligam ao alto custo dos adubos nitrogenados, que reflete o custo dos componentes de sua síntese industrial, obtidos a partir do petróleo, onde se torna economicamente insustentável, a médio ou em longo prazo (DÖBEREINER, 1997; ANDRADE & KARIA, 2000).

Então, considerando-se a extensão territorial das pastagens existentes e o seu nível de degradação (DE FARIA et al., 1997), assim como a linearidade da resposta das gramíneas forrageiras a altas doses de N (FERNANDES & ROSSIELLO, 1986; MARTHA-JUNIOR et al., 2004; VIANA et al., 2011), parece razoável concluir que o uso regular de adubos nitrogenados não pode ser concebido como uma solução geral ou exclusiva para o problema da conservação produtiva dos recursos forrageiros do país.

Já o uso de leguminosas em consórcio com as gramíneas, supõe uma via biológica de introdução de N no sistema de produção, através dos mecanismos de transferência para o solo, do N₂ atmosférico fixado por essas forrageiras via bactérias do gênero *Rhizobium*. Com isso, aumenta-se indiretamente a capacidade de suporte da pastagem, prolongando a produção de forragem (CANTARUTTI & BODDEY, 1997). Além disso, a presença das leguminosas no consórcio oferece outras vantagens. É sabido que a diminuição da produção e valor nutritivo de gramíneas tropicais forrageiras no período da seca reflete-se diretamente na produção animal. Com a inclusão de leguminosa num pasto de gramínea pura, ocorre uma melhor distribuição da produção anual de forragem em oferta, devido a maior tolerância à seca que mostram algumas das espécies de leguminosas usadas em consórcio, em relação às gramíneas forrageiras (KLUSMANN, 1988). Embora esta alternativa tenha o atrativo da sua competitividade frente à opção da fertilização química, tanto em termos econômicos (redução de custos) como agroecológicos (conservação do N e da matéria orgânica do solo), deve ser observado que os resultados obtidos ao presente, são controversos.

No que diz respeito ao Brasil, o tema da introdução de leguminosas forrageiras tem sido abordado constantemente nos eventos técnico-científicos de pastagens e adubos verdes (ALVES & MEDEIROS, 1997), e as vantagens da utilização de consórcios formados por gramíneas e leguminosas são bastante conhecidas entre pesquisadores, extensionistas e produtores (PEREIRA, 2001). Ainda de acordo com PEREIRA (2001), a comparação entre a produtividade de pastagens consorciadas e adubadas com N mineral é uma preocupação que remonta ao princípio das pesquisas com forrageiras. Embora esta alternativa tenha o atrativo da sua competitividade frente à opção da fertilização química, tanto em termos econômicos como agroecológicos (conservação do N e da matéria orgânica do solo), deve ser observado que os resultados obtidos, são ainda objetos de certa controvérsia (PEREIRA, 2001). Segundo

opinião de alguns pesquisadores da área (PEREIRA, 2001), isto retroage a discussão há mais de três décadas.

Com efeito, durante a década de 70, na América Latina buscou-se estimular a produção pecuária através de planos de incentivo à instalação de pastagens consorciadas, a partir de investimentos governamentais suportados por agências de fomento internacionais. Neste contexto, houve pouca preocupação com a origem dos cultivares a serem utilizadas nos projetos. Esses cultivares foram desenvolvidos, em geral, para solos de alta fertilidade e sob condições ambientais totalmente diversas. Consequentemente, com a falta de conhecimento técnico sobre essas espécies, houve o inevitável fracasso desses projetos (ROLON & PRIMO, 1979). Certamente, o fracasso dessas tentativas de introdução de consorciações gramínea-leguminosa e da conseqüente tentativa de promover o efetivo uso das pastagens consorciadas ainda hoje oferece resistência a sua maior utilização no Brasil (NASCIMENTO-JUNIOR et al., 2003; BARCELLOS et al., 2008).

Há muito tempo se sabe que as famílias *Poaceae* e *Fabaceae* possuem características morfológicas, anatômicas e fisiológicas distintas que tornam difícil o seu desenvolvimento em conjunto. Uma diferença básica radica na eficiência fotossintética, uma vez que as leguminosas possuem a via C_3 (ciclo fotossintético de fixação de carbono), enquanto que as gramíneas tropicais são do tipo C_4 , o que determina maiores taxas de crescimento nas monocotiledôneas (LARCHER, 2000; TAIZ & ZEIGER 2009). Da mesma forma, a pesquisa tem identificado e contrastado diferenças, entre as interações (interferência) por fatores abióticos (competição) ou bióticos (interação química entre as plantas) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004). Entende-se por interferência por competição a concorrência por diversos recursos, incluindo luz, nutrientes e água, dentro e entre as espécies presentes (FERREIRA & BORGHETTI, 2004; TAIZ & ZEIGER 2009). Por outro lado, a interferência biótica, é aquela onde a planta (doadora) produz substâncias químicas (metabólitos secundários) que podem provocar efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, na germinação e crescimento de outras plantas adjacentes (receptoras) (RICE, 1984; DEUBER, 1992; KOBAYASHI, 2004; LARA-NUNEZ et al., 2009). Esse fenômeno é conhecido como alelopatia, importante na resposta ecológica, e que pode alterar o padrão e a densidade das comunidades de plantas. O termo alelopatia é oriundo do grego, onde *allelon* significa “mútuo” e *pathos* “causar doença ou sofrimento” (FERREIRA & AQUILA, 2000).

Todavia, em termos gerais o que difere os dois processos discutidos acima, é que na competição um fator de crescimento fundamental ao desenvolvimento das plantas é reduzido ou removido do ambiente, enquanto na alelopatia uma substância é acrescida ao meio (FERREIRA & AQUILA, 2000). É interessante ressaltar que, em algumas situações, esses processos podem ocorrer simultaneamente (RICE, 1984).

2.1.1 Metabolismo secundário em plantas

De acordo com Taiz & Zeiger (2009), as plantas produzem metabólitos primários e secundários, também considerados metabólitos especiais. No primeiro caso são realizados processos metabólicos essenciais à sobrevivência celular. Em contrapartida, no metabolismo secundário as substâncias produzidas nem sempre são necessárias para que a planta tenha seu ciclo completado, mas sim a função de interação com o meio. Nas plantas existem metabólitos oriundos do metabolismo secundário com propriedades alelopáticas. Tais substâncias geralmente pertencem ao grupo dos ácidos e compostos associados, derivados das reações de formação do ácido chiquímico, malônico, mevalônico e Rota do metileritritol fosfato (MEP) conforme Figura 1 (CHOU & WALLER, 1989; CARVALHO et al., 1993; FERREIRA & AQUILA, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2009).

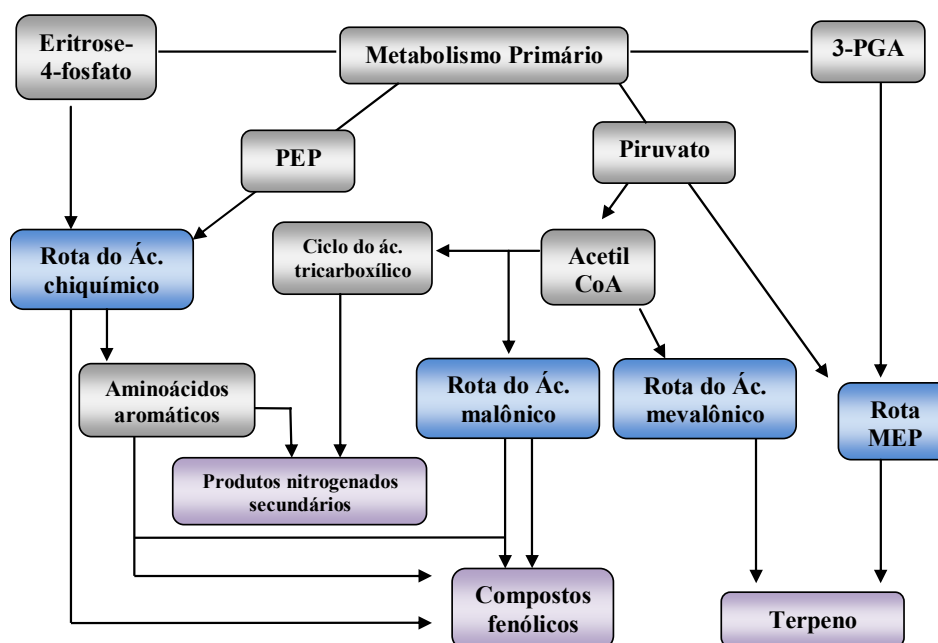


Figura 1. Esquematização simplificada da rota de biossíntese de metabólitos secundários. PEP: fosfoenolpiruvato; 3-PGA: 3- fosfoglicerato; MEP: Rota do metileritritol fosfato. Fonte: Modificado de Taiz & Zeiger (2009).

Vale salientar que, na prática, é difícil isolar o efeito nocivo, via alelopatia, de uma planta sobre a outra (SOUZA et al, 2003). No entanto, estudos têm sido conduzidos na tentativa de caracterizar as classes de metabólitos ou até mesmo determinar a estrutura química de moléculas responsáveis por este efeito biológico.

Há que considerar ainda os fatores ligados ao sistema de pastejo, que certamente interferirão também na persistência da leguminosa (LASCANO, 1999). Nesse sentido, Durigan & Almeida (1993) observaram que os taninos produzidos por algumas plantas forrageiras podem ser acumulados e assim conferir um sabor amargo e/ou adstringente. Esse mecanismo pode representar uma defesa contra o pastejo, pois os animais selecionam as forrageiras preferenciais por sua palatabilidade. Entende-se então que algumas plantas produzem essas substâncias como ferramenta de defesa contra a herbivoria, além de atuarem contra patógenos e insetos (GIVENS et al., 2000; SANTOS, 2006). Já no que diz respeito aos efeitos alelopáticos, essas substâncias devem ser liberadas para o meio ambiente por diferentes formas e assim ter contato com as plantas receptoras.

2.1.2 Liberação dos metabólitos no meio ambiente

As plantas podem liberar seus aleloquímicos de várias maneiras diferentes: volatilização, lixiviação, exsudação e decomposição de resíduos vegetais (RICE 1984; CHOU, 1999; ZHANG et al. 2010). Na figura 2 são mostradas as rotas mais prováveis pelos quais os aleloquímicos são lançados no ambiente.

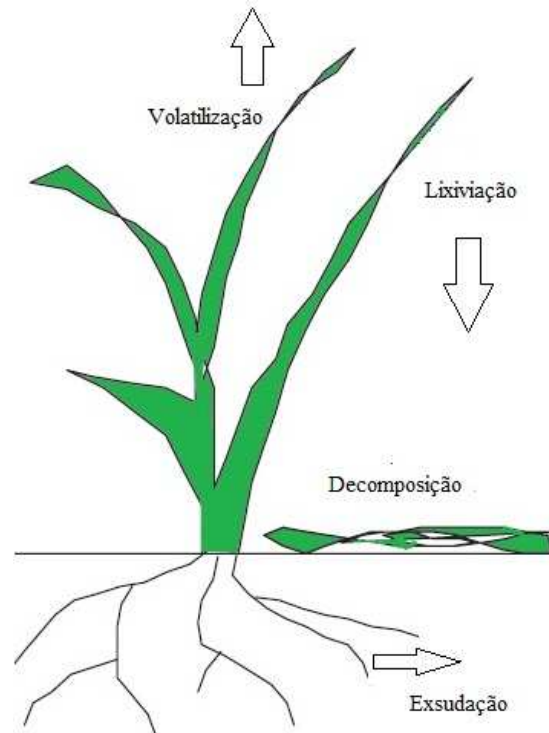


Figura 2. Rota de liberação dos aleloquímicos da planta para o ambiente. Fonte: Modificado de Yamamoto (2009).

No processo de volatilização as substâncias são liberadas a partir das folhas, e em seguida são absorvidas por outra planta (RICE 1984). A caracterização do perfil dos aleloquímicos voláteis é considerada bastante complexa, uma vez que essas moléculas se perdem facilmente para a atmosfera. Grande parte das substâncias encontradas nos compostos voláteis pertencem ao grupo químico dos terpenos (RIZVI & RIZVI, 1992), que constituem a maior classe de metabólitos secundários. Em algumas situações os compostos dessa classe são considerados metabólitos primários, como no caso das giberelinas, fito hormônio diterpênico que atua na regulação do crescimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009). Em geral, os terpenos são moléculas insolúveis em água, e servem como precursores para uma gama de componentes essenciais dentro do sistema biológico vegetal. Entre esses compostos, os monoterpenos e sesquiterpenos possuem um papel importante em interações alelopáticas (PUTNAM, 1988; ABRAHIM et al., 2000).

Os metabólitos secundários presentes na parte aérea dos vegetais podem ainda ser introduzidos no ambiente através da lixiviação, a partir da lavagem das folhas pela água das chuvas ou pelo orvalho (RICE 1984; ZHANG et al., 2010). Nos processos de decomposição dos resíduos vegetais, após o rompimento das células e consequente extravasamento do conteúdo celular, os metabolitos podem ser carregados através do solo (RICE 1984; ALMEIDA, 1988). Essas biomoléculas podem influenciar a microbiota do solo, que por sua vez podem interferir direta ou indiretamente na biologia das plantas receptoras associadas (QASEM & HILL, 1989; CHAPMAN, 2003; BAINS et al., 2009).

Existe uma grande discussão a respeito do efeito das moléculas exsudadas pelas raízes, uma vez que nem sempre são essas substâncias que causam interferência no desenvolvimento de plantas vizinhas. É difícil atribuir com precisão se o estímulo ou a redução da germinação, ou mesmo o crescimento das plantas receptoras, é uma resposta às moléculas provindas da exsudação radicular, se provém dos microrganismos presentes no solo ou se é originária de outras fontes (ALMEIDA, 1988; MALHEIROS & PERES, 2001). Essas substâncias podem

ainda sofrer transformações pela ação do meio ou por influência da microbiota do solo, e ter sua atividade biológica diminuída ou potencializada (RADOSEVISH & HOLT, 1984).

Desse ponto de vista, os estudos realizados em ambiente sob condições controladas são de extrema importância para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos processos de alelopatia. Por isso, a grande maioria dos trabalhos realizados para a avaliação do potencial alelopático é conduzida em laboratórios, dentro de câmaras de crescimento ou mesmo em casa de vegetação, onde há um maior controle experimental.

2.1.3 Obtenção e identificação de substâncias bioativas

Normalmente as técnicas utilizadas com mais frequência em estudos de alelopatia envolvem bioensaios de germinação em câmaras de crescimento (CHIAPUSIO et al., 1997; FERREIRA & BORGHETTI, 2004). Nestas condições ocorre a aplicação de soluções obtidas a partir de extração com solventes orgânicos utilizados para retirar as substâncias presentes na planta em estudo (LEATHER & EINHELLIG, 1986; SOUZA FILHO et al., 2010).

As técnicas de extração mais utilizadas envolvem o preparo de extratos aquosos foliares e, em menor proporção, do sistema radicular (RODRIGUES et al., 1992; WESTON, 1996). Além destes, procedimentos experimentais mais apurados que permitem o isolamento e a determinação estrutural dos constituintes químicos envolvidos na atividade alelopática das plantas vêm sendo utilizadas com mais frequência nestes estudos de alelopatia (SOUZA FILHO et al., 2010; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

Todavia, deve ser salientado que, na maioria das vezes, a alelopatia é o resultado da ação de um conjunto de substâncias, sendo rara a ação de uma única substância isolada. Essa ação conjunta é conhecida como relação sinérgica, e resulta em modificações no desenvolvimento e no crescimento das plantas receptoras (WILLIAMSON, 1990).

Desta forma, para o avanço nas pesquisas com alelopatia de pastagens consorciadas há a necessidade de se obter a caracterização química das gramíneas utilizadas nos consórcios. Para isso é importante obter informações sobre a que classe química pertencem os aleloquímicos isolados nas forrageiras, assim como, sua correta estrutura química.

As informações associadas à atividade alelopática destas gramíneas sobre as diferentes espécies de leguminosas forrageiras e de adubação verde fornecerão a base de conhecimentos necessários para proporcionar maior harmonia entre essas espécies em cultivo consorciado, e assim podendo contribuir para o efetivo uso de pastagens consorciadas que ainda é considerado insignificante (BARCELLOS et al., 2008).

Nesse sentido, a prospecção fitoquímica pode ser utilizada para verificar a classe dos metabolitos secundários presentes em extratos de plantas de uma maneira geral; porém, o resultado pode ser mascarado pela cor do sistema formado durante a análise química e a interpretação da prova. Daí a importância da utilização de métodos físicos de análise orgânica como parâmetro adicional à análise química. Um exemplo é a Ressonância Magnética Nuclear ^1H ^{13}C (RMN ^1H) que, em muitos casos pode confirmar ou excluir a presença de determinada classe de metabolitos secundários detectados quimicamente.

De acordo com Santos et al. (2011), dentre as técnicas normalmente empregadas nas análises de extratos vegetais estão as cromatográficas, que demandam tempo e uma grande quantidade de reagentes orgânicos, principalmente quando envolve misturas complexas como extratos brutos de plantas. Já a técnica Eletroforese Capilar (EC) é um método microanalítico que se baseia na separação de partículas carregadas eletricamente (podendo ser gerada pelo pH do meio), quando estão sob a influência de um campo elétrico (KUHN & HOFFSTETTER-KUHN, 1993). A EC que é uma técnica aplicável na determinação de uma grande variedade de amostras tem sido utilizada para análise de extratos de plantas e óleos

essenciais, principalmente porque permite a injeção direta dos extratos sem necessidade de purificação dos princípios ativos, utilização de volumes reduzidos de amostras, baixo consumo de reagentes e automação das análises (SANTOS et al., 2007). Os autores relataram que os protocolos de EC foram altamente específicos, sendo possível identificar cinco classes de compostos contidos em extratos brutos da espécie avaliada.

Neste sentido, PUTNAM (1988) agrupam os aleloquímicos em cinco classes, como ácido cinâmico, terpenos, alcaloides, esteroides e flavonoides. Esses autores relatam que muitos compostos podem ocorrer na forma glicosilada dentro dos vacúolos nas células vegetais, estando dessa maneira inócuas. Outro fator a se considerar é que essas moléculas podem ser provenientes de diferentes órgãos, incluindo folhas, flores e frutos das plantas, daí a importância de se pesquisar as diferentes partes das plantas (RICE, 1984).

De uma forma geral, em se tratando de mecanismo de ação dos agentes alelopáticos, diferentes processos metabólicos são afetados (IMATOMI, 2010). Entretanto, os principais são: a inibição da germinação por interrupção da divisão celular (TEERARAK et al., 2010), a interferência nos mecanismos de transferência de energia, tais como a respiração e fotossíntese (ABRAHIM et al. 2000) e alterações na permeabilidade da membrana celular (BOGATEK et al., 2005).

2.1.4 Atividade alelopática do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb.

Há poucas informações disponíveis sobre atividade alelopática da *Brachiaria* exercida sobre leguminosas forrageiras e de adubação verde. Embora existam muitas lacunas sobre as interações químicas existentes entre gramíneas e leguminosas forrageiras, os trabalhos encontrados, indicam um elevado potencial alelopático para este gênero (VIDAL et al., 1986; STANIZIO et al., 1991; BARBOSA et al., 2008; SENARATHNE et al., 2010).

Os primeiros estudos avaliando o potencial alelopático das forrageiras do gênero *Brachiaria* tiveram início na década de 70, aproximadamente após uma década do início de sua difusão como planta forrageira no Brasil (SOUZA FILHO & ALVES, 1998). Muito embora essas relações possivelmente fossem observadas na prática, em ambientes de consórcio, esta interação era ainda desacreditada. A maior parte dos estudos com estas espécies seguiram no sentido de avaliar o seu potencial produtivo, e mais tarde questões sobre a toxicidade para os animais.

Com efeito, Voll et al. (2004) realizaram um trabalho com o objetivo de caracterizar os compostos químicos com atividade alelopática da *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc, também conhecido como capim-marmelada. Segundo os autores, foi observada a inibição da germinação das plantas espontâneas *Acanthospermum hispidum* DC. e *Commelina benghalensis* (L.). Foi detectada na *B. plantaginea* (capim-marmelada), uma alta concentração do ácido acotínico (Figura 3) e em menor quantidade, os ácidos fenólicos. Os autores observaram que além dessas substâncias, existem outras substâncias alelopáticas que não foram identificadas. Eles observaram ainda que houve a ocorrência de fungos endofíticos como respostas aos compostos orgânicos oriundos dessa *Brachiaria*. Em consonância a esses resultados, Vidal et al. (1986) descreveram o potencial alelopático do capim-marmelada sobre algumas culturas anuais, embora não tenham conseguido caracterizar seu aleloquímico.

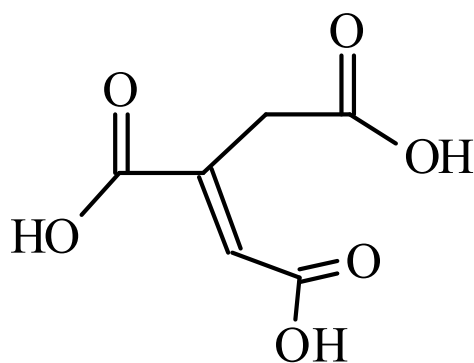


Figura 3. Estrutura química do ácido acotínico. Fonte: Voll et al., 2004.

Dada sua grande importância como planta forrageira e sua crescente utilização nos campos de pastagens, a *B. brizantha* foi estudada por Stanizio et al. (1991), que avaliaram o seu efeito alelopático sobre o crescimento de plântulas das leguminosas *Stylosanthes guianensis* (Abl.) Sw., e *Centrosema brasilianum* (L.) Benth. Os autores utilizaram o extrato aquoso da parte aérea, nas concentrações de 0, 25, 50 e 100%, e observaram que esses extratos não afetaram a germinação, o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das sementes de *C. brasilianum*, mas reduziram o comprimento desses mesmos órgãos de *S. guianensis*.

Senarathne et al. (2010) realizou um estudo usando extratos, exsudatos e solo aderido da região radicular de *B. brizantha* e *B. milliformis*, sobre as espécies *Raphanus sativus*, *Capsicum annum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Crotalaria junica* L. e *Chromoleana odorata* (L.) King & Rabinson. Neste trabalho, ambas as espécies de braquiária produziram efeito inibitório, no entanto a *B. brizantha* resultou em um maior efeito sobre as receptoras utilizadas. Em relação as amostras, o exsudatos das raízes das espécies doadoras foram as que resultaram em maior atividade alelopática.

Em estudos realizados por Santos et al. (2008) foram isolados os triterpenos friedelina e epifriedelinol (Figura 4) da parte aérea de *B. brizantha* cv. Marandu, os quais apresentaram efeito inibitório na germinação das plantas espontâneas *Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* L. Irwin & Barneby. Essas substâncias foram testadas isoladamente ou em mistura, onde ambas a friedelina e epifriedelinol não diferiram entre si quando aplicados separadamente sobre a *M. pudica*. Já na aplicação sobre a *S. obtusifolia*, a friedelina mostrou atividade alelopática superior à epifriedelinol. Nos testes com as sementes de *M. pudica*, as duas substâncias misturadas resultou num efeito inibitório (50%) mais elevado do que as substâncias testadas separadamente. Este efeito foi menos intenso na espécie *S. obtusifolia*.

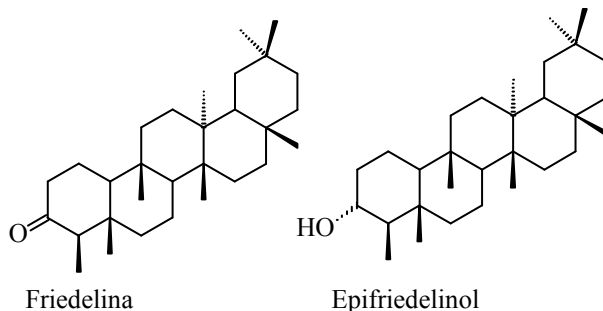


Figura 4. Estrutura das substâncias friedelina e epifriedelinol. Fonte: Santos et al. (2008).

Bocchese et al. (2007) mencionam que não houve efeito alelopático de mudas de *B. brizantha* sobre três espécies florestais nativas do cerrado brasileiro e *Eucalyptus citriodora*. Já nos estudos desenvolvidos por Souza et al. (2003) que utilizaram uma outra importante espécie do gênero (*Brachiaria decumbens*), foi observado efeito alelopático no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis* em condições de casa de vegetação. Outros estudos com *B. decumbens* que indicam que as saponinas esteroidais litogênicas são responsáveis pelas características tóxicas dessa espécie (SMITH & MILES, 1993; CRUZ et al., 2000; BRUM et al., 2009). Em estudo realizado por SOUZA et al., (1997), os efeitos alelopáticos da matéria seca da parte aérea de *B. decumbens* observou-se que quando foi incorporada ao solo utilizado para o cultivo inicial de limão cravo (*Citrus limonia*) promoveram a inibição do crescimento dessas plantas. Em outro estudo com *B. decumbens*, saponinas e sapogeninas foram as principais substâncias detectadas nos extratos e que podem estar diretamente envolvidas na atividade alelopática desta espécie (HARAGUCHI et al., 2003). Esses resultados sugerem que dentro do gênero *Brachiaria* podem existir constituintes químicos de diferentes classes de metabolitos com potencial alelopático.

Em uma revisão realizada por Riet-Correa et al. (2011) sobre a intoxicação por *Brachiaria* spp. em ruminantes no Brasil, foi considerado que a maioria dos surtos de fotossensibilização hepatógena é causada por *Brachiaria decumbens*; mas *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* podem também causar intoxicação. Os autores relataram que o envenenamento pelo consumo destas braquiárias é consequência do alto teor de saponina contido nessas espécies. Os mesmos sugerem programas de melhoramento vegetal visando à obtenção de plantas com menores quantidades desse metabólito para amenizar esse cenário.

Como discutido anteriormente, a forrageira *B. humidicola* está entre as três mais utilizadas dentro deste gênero na formação de pastagens no Brasil (PERON & EVANGELISTA, 2004; VALLE et al., 2010). O uso dessa espécie está crescendo, principalmente no Norte do Brasil, muitas vezes em substituição a espécie *B. decumbens*, devido a sua maior tolerância a cigarrinha das pastagens (SEIFFERT, 1980).

Embora hajam poucos trabalhos relacionados a prospecção química de *B. humidicola* ou aos seus efeitos alelopáticos sobre leguminosas, existem informações que mostram seu potencial alelopático sobre plantas espontâneas, com a inibição da germinação de sementes e o alongamento da radícula em diferentes espécies (REZENDE et al., 2003).

Na parte aérea de *B. humidicola*, especificamente foi isolada uma fração com atividade fitotóxica, cujo princípio ativo foi identificado como sendo o ácido *p*-cumárico, um intermediário na biossíntese dos flavonóides (SOUZA-FILHO et al., 2005). Tal substância inibiu a germinação das sementes e ou o alongamento da radícula em espécies invasoras de pastagens (*M. pudica* e *S. occidentalis*). Um extrato aquoso da parte aérea de *B. humidicola* reduziu em quase 50% o alongamento da radícula de *Desmodium adscendens* (Sw.) D.C. (SOUZA-FILHO et al., 1997). Em outro estudo verificou-se que extratos aquosos obtidos de três espécies de *Brachiaria* (*B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. brizantha* cv. Marandu) diminuíram a germinação de sementes em algumas espécies de leguminosas, sendo que a porcentagem de sementes mortas em *S. guianensis* superou as demais (REZENDE et al., 2003). É interessante observar que, além desses estudos, pesquisas têm sugerido que esta espécie possui a capacidade de inibir o processo de nitrificação do nitrogênio no solo. A brachiolactona (Figura 5), uma substância isolada da raiz de *B. humidicola*, é um diterpeno cíclico com ação inibidora da nitrificação (SUBBARAO et al., 2009).

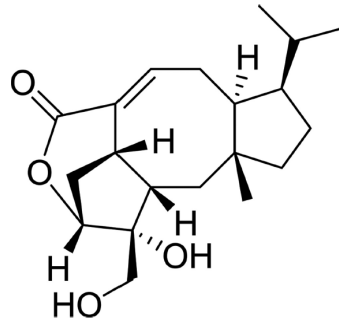


Figura 5. Estrutura da brachiolactona. Fonte: Subbarao et al. (2009).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABRAHIM, D. BRAGUINI, W.L.; KELMER-BRACHT, A.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth and mitochondrial respiration of maize. **J. Chem. Ecol.**, v.26, n.3, p. 611-624, 2000.

ALENCAR, K.M.C.; RODRIGUES, A.P.D.C.; PEREIRA, S.R.; LAURA, V.A. Priming of *Stylosanthes* seeds. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p. 627-632, 2012.

ALMEIDA, F.S. **Alelopatia e as plantas**. Circular 53, Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, PR, 1988. 60p.

ALVES, S.J.; MEDEIROS, F.B. Leguminosas em renovação de pastagens. In: Simpósio sobre Ecossistema de Pastagens, III. SP: FAPES/UNES, 1997. **Anais...** p. 251-273.

ANDRADE, R.P., KARIA, C.T. Uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. 2000, Lavras. **ANAI DO SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: TEMAS EM EVIDÊNCIA**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000.

BAINS, G.; KUMAR, A.S.; RUDRAPPA, T.; ALFF, E.; HANSON, T.E.; BAIS, HARSH P. Native Plant and Microbial Contributions to a Negative Plant-Plant Interaction. **Plant Physiology**, v.151, p. 2145–215, 2009.

BARBOSA, E.G.; PIVELLO, V.R.; MEIRELLES, S.T. Allelopathic Evidence in *Brachiaria decumbens* and its Potential to Invade the Brazilian Cerrados. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v.5, p.825-831, 2008.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustainability of animal production based on mixed pastures and exclusive use of legumes in the form of protein bank in the tropical Brazilian. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. spe, p. 51-67, 2008.

BERNARDI, A.C.C.; OLIVEIRA, P.P.A.; PRIMAVESI, O. Soil fertility of tropical intensively managed forage system for grazing cattle in Brazil. In: J. K. Whalen (Ed.) **Soil fertility improvement and integrated nutrient management - A global perspective Rijeka**: In Tech Open Access, 2012, p. 37-56.

BHADORIA, P.B.S. Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management. **American Journal of Experimental Agriculture**, v.1, n.1, p.7-20, 2011.

BOCCHESI, R.A.; MELOTTO, A.M.; COSTA FILHO, L.C.C.; FERNANDES, V.; NICODEMO, M.L.F.; LAURA, V.A. Avaliação da competição entre *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, espécies arbóreas nativas do Cerrado e *Eucalyptus citriodora*. **R. Bras. Bioci.**, v.5, n.5, p.153-155, 2007.

BODDEY, R. M.; RESENDE, C. P.; SCKUNKE, R. M.; et al. Sustentabilidade de pastagens consorciadas e da gramínea em monocultura: o papel chave das transformações de nitrogênio. In: Simpósio sobre o Meio Ambiente, os Recursos Naturais e a Produção Animal, XXX. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. **Reunião Anual ...** p. 141-173.

BODDEY, R.M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O.C.; REZENDE, C.P.; CANTARUTTI, R.B.; PEREIRA, J.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.103, n.2, p. 389-403, 2004.

BOGATEK, R.; ORACZ, K.; GNIAZDOWSKA, A. Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Fourth World Congress on Allelopathy, 2005.

BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C., Quantitative anatomy of leaves and stems of *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf and *B. humidicola* (Rendle) Schweick. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, pp. 519-528, 2004.

BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M.B.; NÓBREGA, F.N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M.C.S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Cienc. Rural**, v.39, n.1, 2009.

CALLAWAY, R.M. The detection of neighbors by plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.17, p. 104-105, 2002.

CANTARUTTI, R.B.; BODDEY, R.M. Transferência de nitrogênio das leguminosas para as gramíneas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1997. p.431-446.

CANTARUTTI, R.B.; TARRÉ, R.M.; MACEDO, R.; CADISCH, G.; RESENDE, C.P.; PEREIRA, J.M.; BRAGA, J.M.; GOMEDE, J.A.; FERREIRA, E.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. The effect of grazing intensity and the presence of a forage legume on nitrogen dynamics in *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystem**, v.64, p.257-271, 2002.

CARVALHO, S.I.C.; NASCIMENTO-JUNIOR, D.; ALVARENGA, E.M.; REGAZZI, A.J. Efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento de plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris e cv. Bandeirantes. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.22, n.6, p. 930-936, 1993.

CHAPMAN, R. F. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.48, p.455-484, 2003.

CHIAPUSIO, G.; SANCHEZ, A.M.; REIGOSA, M.J.; GONZALEZ, L.; PELLISSIER, F. Do germination indices adequately reflect allelochemical effect on the germination process? **J. Chemical Ecol.**, 23: 2445-5, 1997.

CHOU, C.H.; WALLER, G.R. **Phytochemical Ecology**: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and allomones. Série Monografia, Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 1989. 504 p.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Rev. Plant Sci.**, v.18, p. 609-636, 1999.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.S.; COLODEL, E.M.; TAKETA, A.T.C.;

SCHENKEL, E.P. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.42, n.3, p. 142-145, 2000.

DE FARIA, V. P.; PEDREIRA, C. G. S.; SANTOS, F. A. P. Evolução do uso de pastagens para bovinos. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem, XIII. 1997. **Anais...** p. 1-14.

DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas: fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. v. 1, 431 p.

DIAS FILHO, M.B. Limitações e potencial de *Brachiaria humidicola* para tópicos úmidos brasileiros. Embrapa – CPATU, 1983, 28p. (Embrapa - CPATU Documento 20).

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biological Biochemistry**, v. 29, p. 771-774, 1997.

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

EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.; MACEDO, M.C. M.; ALMEIDA, R.G.; MONTAGNER, D.B. BARBOSA, R.A. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, pp. 151-168, 2010.

FERNANDES, A.M.; ANDRADE, G.J.M.; SOUZA, E.F.C.; ROSOLEM, C.A. *Brachiaria* species affecting soil nitrification. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v.35, n.5, p. 1699-1706, 2011.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Aspectos do metabolismo e utilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: MATTOS, H. B., WERNER, J. C., YAMADA, T., MALAVOLTA, E. **Calagem e adubação de pastagens**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986, p. 93-123.

FERRAZ, F.M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE I.J. (Ed.). Anualpec – Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2003. p.55-56.

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

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

GENNI, O.; BARUCH, Z.; MARIN, D. Responses to drought of five *Brachiaria* species. II. Water relations and leaf gas exchange. **Plant and Soil**, v.258, p. 249-260, 2004.

GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. **Forage evaluation in ruminant nutrition**, Cabi Publishing, London. 480 p, 2000.

HARAGUCHI, M.; CUNHA, H.A.; MIMAKI, Y.; BRUM, K.B.; LEMOS, R.A.A.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria*

decumbens. 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas. 2003.

IMATOMI, M. Estudo alelopático de espécies da família myrtaceae do cerrado. São Carlos, UFSCar, 2011. 88P. (Tese de Doutorado), 2010.

JACOB, J.; SARADA, S. Role of phenolics in allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v.29, n.2, p. 215-230, 2012.

JARVIS, S.C.; SCHOLEFIELD, D.; PAIN, B. **Nitrogen cycling in grazing systems**. In: **Nitrogen fertilization in the environment**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasma collections. In: MILLES, J.W.; MASS, B.L.; VALLE, C.B., ed. *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Cali: CIAT/Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 16-42.

KHANH, T.D.; CHUNG, I.M.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.191, n.3, p. 172-184, 2005.

KLUSMANN, C. Trees and shrubs for animal production in tropical and subtropical areas. **Plant Research and Development**, Tuebingen, v.27, p.92-104, 1988.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v.4, p.1-7, 2004.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S., **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice**, Springer Laboratory, Berlin, 1993.

LARA-NUNEZ, A.; SANCHEZ-NIETO, S.; ANAYA, A.L.; CRUZ-ORTEGA, R. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Curcubitaceae) in germinating tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, v.136, p. 180-192, 2009.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Editora, 2000. 531p.

LASCANO, C.E. Selective grazing on grass-legume mixtures in tropical pastures. In: Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology, Paraná: 1999. **Anais...** p. 151-164.

LEATHER, G.R.; EINHELLIG, F.A. Bioassays in the study of allelopathy. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. (Eds.). **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 133-143.

MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; REZENDE, C.P.; PEREIRA, J.M.; CADISCH, G.; ROUWS, J.R.C.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Forage intake and botanical composition of feed for cattle fed *Brachiaria*/legume mixtures. **Scientia Agricola**, v.67, n.4, pp. 384-392, 2010.

MALHEIROS, A; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In:

Yunes RA, Calixto JB. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523, 2001.

MARTHA-JUNIOR, G.B.; CORSI, M.; TRIVELIN, P. C. O.; ALVES, M.C. Nitrogen recovery and loss in a fertilized elephant grass pasture. **Grass & Forage Science**, v.59, n.1, p.80-90, 2004.

MARTINS, D.; MARTINS, C. C.; COSTA, N. V. Potencial alelopático de soluções de solo cultivado com *Brachiaria brizantha*: efeitos sobre a germinação de gramíneas forrageiras e plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v. 24, n.1, p.61-70, 2006.

NASCIMENTO-JUNIOR, D.; BARBOSA, R.A.; MARCELINO, K.R.A.; GARCEZ NETO, A.F., DIFANTE, G.S., ADESE, B. A. **A produção animal em pastagens no Brasil: uso do conhecimento técnico e resultados** In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem: Produção Animal em Pastagens, XX. Piracicaba: FEALQ, 2003. **Anais...** p. 1-82.

OLIVEIRA, O.C. **Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de pastagens de *Brachiaria* spp. no Cerrado brasileiro**. Seropédica: UFRRJ, 2000. 243p. (Tese de Doutorado).

PEREIRA, J.M. Produção e Persistência de Leguminosas em Pastagens Tropicais. In: II Simpósio de Forrageiras e Pastagens. In: Simpósio de Forrageiras e Pastagens - TEMAS EM EVIDÊNCIA, II. Lavras, MG: Núcleo de Estudos em Forragicultura-UFLA, 2001. p. 111-142.

PERON, A.J.; EVANGELISTA, A.R. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.655-661, 2004.

PUTNAM, A.R. Allelochemicals from plants as herbicides. **Weed Technol.**, v.2, p. 510-518, 1988.

QASEM, J.R.; HILL, T.A. On difficulties with allelopathy methodology, **Weed Res.**, 29, p.345, 1989.

RADOSEVICH, S.R., HOLT, J.S. **Weed ecology: implications for vegetation management**. New York: John Willey, 1984. 265p.

RAO, I.M.; AYARZA, M.A.; GARCIA, R. Adaptive attributes of tropical forage species to acid soils I. Differences in plant growth, nutrient acquisition and nutrient utilization among C₄ grasses and C₃ legumes. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.10, p.2135-2155, 1995.

REJILA, S.; VIJAYAKUMAR, N.; JAYAKUMAR, M. Chromatographic Determination of Allelochemicals (Phenolic Acids in *Jatropha curcas* by HPTLC. **Asian J. Plant Sci. Res.**, v.2, n.2, p. 123-128, 2012.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim Agropecuário**, v. 54, p. 1-55, 2003.

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

RIDENOUR, W.M.; CALLAWAY, R.M. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. **Oecologia**, v.126, p. 444-450, 2001.

RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, n.3, p.183-192, 2011.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (Eds.). **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, 1992. p.443-472.

ROCHE, R.; MENÉNDEZ, J.; HERNÁNDEZ, J.E. Características morfológicas indispensables para la clasificación de especies del genero *Brachiaria*. **Pastos y Forrages**, v.13, n.3, p.205-222, 1990.

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

ROLON, J. D.; PRIMO, A. Experience in regional demonstration trials in Brazil. In: SANCHES, P. A., TERGAS, L. E. **Pastures productions in acid soils of the tropics**. CIAT, 1979, p. 117-130.

ROSSIELLO, R.O.P.; ANTUNES, M.A.H. Solar radiation utilization by tropical forage grasses: light interception and use efficiency. In: E.B. Babatunde (Ed.) **Solar Radiation**. Rijeka: In Tech Open Access, 2012, p. 221-244.

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

SANTOS, M.A.T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. **Ciências Agrotécnicas**, v.30, n.2, p.294-301, 2006.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. **Eclét. Quim.**, v.32, n.4, p. 13, 2007.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. **Eclét. Quim.**, v.33, n.2, p. 18, 2011.

SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Campo Grande. EMBRAPA-CNPQC. 1980. 48p.

SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; ARACHCHI, L.P.V. Allelopathic

potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v.16, n.2, p. 207-216, 2010.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Microbial populations and activities in highlyweathered acidic soils: highlights of the Brazilian research. In: Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production. (A.C. Moniz et al, Eds.). Campinas: Brazilian Soil Science Society, p. 139-156. 1997.

SILVA, R. R. **Poaceae (Gramineae) da ARIE – Santuário de Vida Silvestre do Riacho Fundo**, Brasília: DF: Universidade de Brasília. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, 2000. 187 p.

SKONIESKI, F.R.; VIEGAS, J.; BERMUDEZ, R.F.; NÖRNBERG, J.L.; ZIECH, M.F.; COSTA, O.A.D.; MEINERZ, G.R. Composição botânica e estrutural e valor nutricional de pastagens de azevém consorciadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, pp.550-556, 2011.

SMITH, A.E. The potential allelopathic of bitter sneezeweed (*Helenium amarum*). **Weed Science**, v.37, p. 665-669, 1989.

SMITH, B.L.; MILES, C.O. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in heotogenous photosensitization of ruminants? **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.35, n.3, 1993.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Alelopatia em ecossistema de pastagem cultivada. Belém: Embrapa – Cpatu, 1998. 72 p. (Embrapa – Cpatu. Documentos, 109).

SOUZA FILHO, A.P.S., GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório –revisão crítica. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.28, n.3, p. 689-697, 2010.

SOUZA L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C.A. Possíveis efeitos alelopáticos de *Brachiaria decumbens* Stapf. sobre o desenvolvimento inicial de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). **Planta Daninha**, v.15, n.2, p. 122-129, 1997.

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

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

SOUZA-FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, p. 25-32, 2005.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. “Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras de pastagens pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. **Pasturas Tropicais**, v.19, n.1. p.45-50, 1997.

STANIZIO, R. M.; LEITE, G. G.; VILELA, L. Efeito alelopático de *Brachiaria brizantha* cv.

Marandu sobre o crescimento de plantas de quatro leguminosas forrageiras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28., 1991, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 1991. p. 95.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **PNAS**, 25:1-6, 2009.

SUBBARAO, G.V.; WANG, H.Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W.L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. **Plant and Soil**, v. 290, n. 1-2, p. 245-257, 2007a.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; WANG, H.Y.; BERRY, W.L. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. **Plant Soil**, 288:101-112, 2006b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, v.101, p.5677-5684, 2010.

URQUIAGA, S.; CADISH, G.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; GILLER, K.E. Influence of decomposition of roots of tropical forage species on the availability of soil nitrogen. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p. 2099-2106, 1998.

VALLE, C.B.D; MACEDO, M.; EUCLIDES, V.P.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. Gênero *Brachiaria*. In: FONSECA, D.M.; MATUSCELLO, J.A. (Org.). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: Editora UFV, 2010, cap.2, p. 30-77.

VIANA, M.C.M.; FREIRE, F.M.; FERREIRA, J.J.; MACÊDO, G.A.R.; CANTARUTTI, R.B.; MASCARENHAS, M.H.T. Adubação nitrogenada na produção e composição química do capim braquiária sob pastejo rotacionado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p.1497-1503, 2011.

VIDAL, R.A., ALMEIDA, F.S., MIZOKAMI, M.M. Efeito alelopático de extratos de capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) no crescimento inicial de algumas culturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 16., Campo Grande, 1986. **Resumos**. ... Campinas: Sociedade Brasileira de Herbicidas e Ervas Daninhas, 1986. p.6.

VOLL, E.; FRANCHINI, J.C.; CRUZ, R.T.; GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M. Chemical Interactions of *Brachiaria plantaginea* with *Commelina bengalensis* and *Acanthospermum hispidum* in Soybean Cropping Systems. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, n.7, p.1467-1475, 2004.

WARDLE, D.A. Allelopathic in New Zealand pasture grassland ecosystem. **New Zealand**

Journal Experimental Agriculture, v.15, p. 243-255, 1987.

WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E. & RAO, I. M. The high level of aluminium resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminium detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, p.1473-1484, 2001.

WERNER, J.C. **Adubação de pastagens**. Nova Odessa, 1984. 49p. (Instituto de Zootecnia. Boletim Técnico, 18).

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

WESTON, L.A.; RYAN, P.R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.9, p. 3445-3454, 2012.

WILLIAMSON, G.B. 1990. Allelopathy, Koch's postulates and the neck riddle. p. 143–162 en: JB Grace & D Tilman (eds). **Perspectives in plant competition**. Academic Press. San Diego, EEUU.

YAMAMOTO, Y. Movement of allelopathic compound coumarin from plant residue of sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.) to soil. **Grassland Sciences**, v.55, p. 36-40, 2009.

XUAN, T.D.; TAWATA, S.; KHANH, T.D.; CHUNG, I.M. Decomposition of allelopathic plants in soil. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.191, n.3, p. 162-171, 2005.

ZHANG, D., ZHANG, J., YANG, W. & WU, F. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. **Ecol. Res.**, v.25, p.13-23, 2010.

ZIMMER, A.H.; CORREA, E.S. A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? In: Encontro sobre Recuperação de Pastagens, II. Nova Odessa: IZ, 1999. **Anais...** p. 3-13.

ZIMMER, A.H.; EUCLIDES, V.P.B. Importância das pastagens para o futuro da pecuária de corte no Brasil. In: Simpósio de Forragicultura e Pastagens, I. Lavras: UFLA, **Anais...**p. 1-49. 2000.

CAPÍTULO I

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Brachiaria humidicola* E EFEITO ALELOPÁTICO SOBRE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS RECOMENDADAS PARA CONSÓRCIO DE PASTAGEM

PHYTOCHEMICAL SCREENING OF *Brachiaria humidicola* AND ALLELOPATHIC EFFECT ON FORAGE LEGUMES RECOMMENDED FOR PASTURES MIXED

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar as classes de substâncias e avaliar a fitotoxicidade de extratos brutos e frações obtidas das diversas partes (raiz, parte aérea e semente) da gramínea *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick, conhecida como “quicuio - da - Amazônia”. Para isso foram realizados testes químicos e bioensaios de fitotoxicidade sobre quatro leguminosas forrageiras de consórcio. Nos extratos obtidos a partir dos solventes hexano, metanol, metanol/água e água, a prospecção fitoquímica revelou teste positivo para as classes de substâncias: açúcares, alcalóides, depsidona e depsídeo, esteroides e triterpenoides, glicosídeos, saponinas, flavonoides, taninos e aminoácidos. Paralelamente a essas análises foram realizados outros procedimentos analíticos, como cromatografia, RMN ¹H e ¹³C e Eletroforese capilar, os quais possibilitaram tanto a detecção de classes de substâncias não reveladas pela prospecção, como a confirmação daquelas detectadas. Os bioensaios de fitotoxicidade realizados sobre leguminosas tropicais revelaram efeito inibitório da germinação de extratos brutos metanólicos, metanólico/aquoso e aquoso. Houve uma elevada inibição da germinação pelos extratos aquosos da parte aérea sobre *Lactuca sativa* L. (espécie padrão usada em estudo de alelopatia), *Stylosanthes* spp.; *Calopogonium mucunoides* Desv. e *Macroyloma axillare* (E. Mey.) Verdc. A espécie de leguminosa forrageira mais tolerante aos aleloquímicos presentes em *B. humidicola* foi *M. axillare*. Essa espécie quando avaliada sobre a aplicação de flavonoides em mistura com ácido transcinâmico, também apresentou maior tolerância, sugerindo um antagonismo com os aleloquímicos presentes. Certamente se a espécie metaboliza flavonóides consome derivados de ácidos cinâmicos, alterando o processo aleloquímico e favorecendo a germinação. Duas misturas de saponinas isoladas a partir da fração metanólica do extrato bruto de raízes causaram intensa redução na germinação de *L. sativa* e *M. axillare*, sugerindo estarem diretamente relacionadas ao efeito alelopático observado em *B. humidicola*. Os testes fitoquímicos caracterizam qualitativamente os metabólitos ou classes deles e podem auxiliar na interpretação dos eventos biológicos em bioensaios de germinação.

Palavras-chave: *Calopogonium mucunoides*. Consórcio de pastagem. *Desmodium ovalifolium*. Germinação. *Macroyloma axillare*. *Stylosanthes* spp.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the classes of substances and assess the phytotoxicity of crude extracts and fractions obtained from various parts of *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick, known as “quicuio- da- Amazonia”. Thus, we performed chemical tests and bioassays phytotoxicity on four forage legumes mixed pastures. In extracts obtained from solvent hexane, methanol, methanol/water and the phytochemical screening revealed positive test for classes of substances: sugars, alkaloids, and depsidona depside, steroids and triterpenes, glycosides, saponins, flavonoids, tannins and amino acids. Alongside these analyzes were performed other procedures as analytical chromatography, RMN ^1H and ^{13}C and capillary electrophoresis, which allowed the detection of both classes of substances not revealed by the survey. The bioassays conducted on phytotoxicity tropical legumes showed inhibitory effect on germination of crude extracts methanol, methanol/aqueous and aqueous. There was a high germination inhibition by the extracts of the aerial part of *Lactuca sativa* L. (species used as a sensitivity standard in allelopathic bioassays), *Stylosanthes* spp.; *Calopogonium mucunoides* Desv. and *Macrotyloma axillare* (E. Mey.) Verdc. The forage legume species more tolerant to allelochemicals present in *B. humidicola* was *M. axillare*. The species *M. axillare* showed higher tolerance to allelochemicals when in the presence of flavonoids, suggesting that antagonism of allelochemicals present. Certainly if the species metabolizes consuming flavonoid derivatives of cinnamic acids by changing the process allelochemical favoring germination. Two mixtures of saponins isolated from the methanolic fraction of the crude extract of roots caused severe reduction in germination of *L. sativa* and *M. axillare*, suggesting they are directly related to the allelopathic effect observed in *B. humidicola*. Tests phytochemicals qualitatively characterize the metabolites or classes of them and can assist in the interpretation of biological events in germination bioassays.

Key words: *Calopogonium mucunoides*. *Desmodium ovalifolium*. Germination. *Macrotyloma axillare*. Mixed pastures. *Stylosanthes* spp.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por estudos acerca dos metabólitos secundários vem aumentando nos últimos anos, em função da busca por produtos naturais, principalmente aqueles que poderiam servir como protótipos de herbicidas sintéticos (KHANH et al., 2005). Além disso, o conhecimento do efeito alelopático entre espécies forrageiras é um dos fatores a ser considerado para o manejo adequado de pastagens (REZENDE et al., 2002; SANTOS et al., 2008), já que informações relativas à interação planta x planta – fenômeno que Molisch, em 1937, denominou de alelopatia influenciam de maneira decisiva na dinâmica das espécies que compõem um agroecossistema (SOUZA-FILHO et al., 2011). Buscar formas de compatibilizar as espécies utilizadas de modo a promover o efetivo uso de pastagens consorciadas é um dos objetivos das pesquisas sobre consorciamento entre espécies, que tem sido utilizada de maneira insignificante, dado seu potencial (BARCELLOS et al., 2008). O conhecimento das relações alelopáticas entre espécies de consórcio podem influenciar decisivamente na implantação e na persistência da leguminosa na pastagem. Além disso, tais informações podem ser úteis para subsidiar a seleção de espécies de leguminosas que sejam mais tolerantes às substâncias tóxicas produzidas por algumas espécies de gramíneas.

Dentre as gramíneas que produzem aleloquímicos com potencial fitotóxico, o gênero *Brachiaria* merece atenção pela sua grande difusão dentro das pastagens brasileiras (REZENDE et al., 2002; SENARATHNE et al., 2010). Em relação ao gênero *Brachiaria* existem trabalhos que indicam a existência de saponinas esteroidais de interesse sobre seus efeitos na nutrição de ruminantes (PIRES et al., 2002; WINA et al., 2005), além da presença de compostos fenólicos com reconhecida atividade fitotóxica sobre espécies de plantas invasoras de pastagens como *Mimosa pudica*, *Senna obtusifolia* e *S. occidentalis* (SOUZA-FILHO et al., 2005).

Outro fator interessante é que, na literatura mundial, observa-se predominância da parte aérea como meio preferencial de estudos de compostos químicos promissores (SOUZA FILHO et al., 2011). Apesar de pouco estudadas, as raízes são partes com intensa atividade e têm se tornado uma importante fonte de substâncias químicas e metabólitos secundários para isolamento e identificação (CAMPOS et al., 2006). No que se refere à utilização de sementes, Souza-Filho et al. (2011) revisaram sua utilização como uma fonte bastante interessante e pouco explorada de aleloquímicos. Segundo esses autores, avanços no isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por outras partes da planta trarão contribuições importantes em relação ao papel que essas substâncias desempenham no campo. Para descrever o perfil químico (metabólitos secundários) de uma dada espécie do reino vegetal, a prospeção fitoquímica pode ser utilizada (MATOS, 1997). Apesar de sua ampla utilização em estudos com produtos naturais, essa metodologia algumas vezes necessita de outras técnicas para a confirmação ou exclusão da presença de determinada classe de metabólitos secundários detectados quimicamente. Dentre elas estão a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de ^1H e ^{13}C , além de técnicas cromatográficas. Entre as metodologias com o uso de cromatografia, a Eletroforese Capilar têm sido relatada como uma forma muito eficaz na detecção e quantificação das principais classes de metabólitos secundários (SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

Embora existam pesquisas que confirmam que a *B. humidicola*, assim como outras espécies de braquiária, possui atividade alelopática (SOUZA et al., 1997), existem poucos relatos dos seus efeitos sobre leguminosas forrageiras tropicais utilizadas em consórcios em pastagens. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica, através de diferentes técnicas, dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *B.*

humidicola (parte aérea, raízes e sementes), além de avaliar as respostas germinativas em laboratório das leguminosas forrageiras tropicais *Stylosanthes* spp., *Macrotyloma axillare*, *Calopogonium mucunoides* e *Desmodium*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia localizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica, RJ (Latitude: 22°46'59" S, Longitude: 43°40'45" W e altitude de 33 m).

2.1 Local de Coleta

A *B. humidicola* (planta doadora) foi coletada em uma pastagem estabelecida há mais de 25 anos sobre um Planossolo Háplico (Figura 1), submetido a pastejos eventuais por caprinos e bovinos (MAGIERO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007).

O solo da área experimental foi descrito por Ramos et al. (1973), sendo classificado como Hidromórfico Cinzento Distrófico, a moderado, textura média, Série Ecologia, que no atual Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 1999), corresponde ao Planossolo Háplico. Tratam - se de solos que apresentam absoluto predomínio de areias nos primeiros 0,5-0,7 m do perfil (Areia grossa = 60-65%; Areia fina: 30-25%; e Argila total < 4%). A partir dessa profundidade ocorre um horizonte B_{tx} de textura barro-argilo-arenosa, e estrutura maciça e dura quando seca, e friável quando úmida (fragipã). Dadas tais propriedades físicas, a capacidade de retenção de água nos horizontes superficiais é muito baixa e a altura do lençol freático oscila sazonalmente (RAMOS et al., 1973).

O clima da região é caracterizado como quente e úmido no verão, sem invernos pronunciados, e muito secos. Este tipo climático, embora não corresponda exatamente ao clima de savanas, enquadra-se no tipo Aw da classificação de Köppen.



Figura 1. Local de coleta de *B. humidicola*. Fonte: Ribeiro (2006).

2.2 Coleta e Processamento do Material Vegetal

O corte da parte aérea (folhas e colmos) foi realizado a 0,05 m acima da superfície do solo. No momento da coleta (dezembro de 2009), a *B. humidicola* estava em estado vegetativo. As raízes foram obtidas através de escavações diretas, que foram favorecidas pela textura arenosa da camada superficial do solo. Um estudo anterior sobre o perfil da distribuição das raízes de *B. humidicola* indicou que a 0,2 m de profundidade do solo estavam concentrados cerca de 70% das raízes grossas e 80% de massa seca de raízes finas em relação ao total de massa seca de raízes a 0,7 m (COSTA et al., 2002). As amostras de raiz foram lavadas para a retirada do solo aderido, conforme descrito por Roberts et al. (1993). Estes procedimentos de amostragem foram feitos na parte da manhã (07:00 hora local) e o material vegetal foi transportado para o laboratório em caixa isotérmica.

As sementes (S) foram coletadas em janeiro de 2010, durante o período de floração da gramínea, e colocadas para secar à sombra em temperatura ambiente.

O material vegetal foi separado em raiz (R) e parte aérea (PA) e após isso foi seco em estufa de circulação forçada de ar, por 72 horas, à temperatura de 45°C, sendo posteriormente triturado em moinho tipo Willey em partículas de 1mm (pó), obtendo-se 4,3 kg de PA e 4,0 kg de R e 3,0 kg de S que foram acondicionados em sacos plástico e mantidos lacrados sob refrigeração ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) até a sua utilização. O material seco e moído foi submetido à extração exaustiva (total retirada das substâncias com afinidade pelo solvente usado), sucessiva e a frio, com solventes de polaridade crescente. O primeiro solvente foi o hexano (H), passando pelo metanol (M), solução de 7 partes de metanol mais 3 partes de água (MA) e por fim água pura (A). Em recipiente de vidro, cada solvente permaneceu em contato com o material vegetal processado durante sete dias, processo repetido seis vezes até a exaustão do material. A solução obtida sofreu filtração simples, e para a sua concentração o filtrado foi destilado sob pressão reduzida, utilizando-se o evaporador rotativo. O concentrado foi colocado em pistola de Abderhalden ou a estufa de circulação forçada a 30°C para sua completa secagem e remoção do solvente. Na figura 2 está representado o fluxograma para a obtenção dos respectivos extratos brutos das três partes (raiz: R, semente: S e parte aérea: F) de *Brachiaria humidicola* (BH) nos solventes: hexano (H); metanol (M); metanol e água (MA) e água (A). A Tabela 1 apresenta o peso de cada extrato bruto, após sua completa secagem.

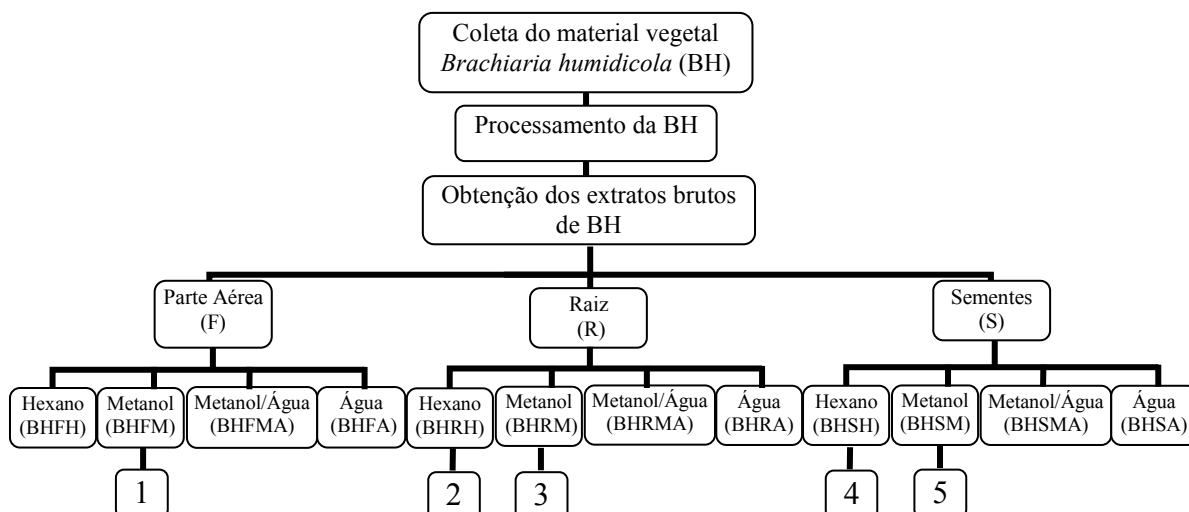


Figura 2. Fluxograma do material e métodos para obtenção dos extratos brutos de *Brachiaria humidicola*. 1: fração em acetato de etila= flavonoides; 2: sitosterol, estgmasterol e ácido graxo; 3: fração em hexano=ácidos graxos, triglicerídeos e flavonóide glicosilado; fração em diclorometano= sitosterol e terpenos; fração em acetato de etila= flavonoides e saponina com um grupo glicosídeo; 4: triglicerídeo e éster graxo; 5: fração em acetato de etila= alantoína.

Tabela 1. Peso do extrato bruto de raiz, parte aérea e sementes de *B. humidicola*, após extração, concentração e secagem.

Amostra	Peso (g)
Hexânico (BHRH)	3,60
Metanólico (BHRM)	69,13
Metanol/Água (BHRMA)	32,50
Água (BHRA)	6,42
Hexânico (BHFH)	7,72
Metanólico (BHFM)	59,87
Metanol/Água (BHFMA)	290,95
Água (BHFA)	179,74
Hexânico (BHSH)	22,75
Metanólico (BHSM)	292,66
Metanol/Água (BHSMA)	89,20
Água (BHSA)	15,60

BH= *Brachiaria humidicola*; R= Raiz; F= Parte Aérea; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol Água; A= Água.

2.3 Prospecção Química e Análise com Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos brutos de *B. humidicola* foram submetidos a uma série de reações de caracterização química para detecção da presença de classes de moléculas (MATOS, 1997): ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, catequinas, depsídeo e depsidona, esteróides e triterpenoides, flavonoides, glicosídeos cardioativos, heterosídeos cianogênicos, quinonas sacarídios, saponinas, antraquinonas, taninos, sesquiterpenos e outras lactonas. Para isso foram utilizados os padrões ácidos cafeico e sitosterol. Os ensaios para a identificação de metabólitos especiais presentes foram feitos para todos os extratos brutos e para as frações

metanólicas da parte aérea de *B. humidicola*.

Nos testes de prospecção química, os resultados foram qualificados quanto à sua intensidade e representados pelos símbolos (+++) presença grande, (++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. No caso de alguns compostos houve a confirmação por análises RMN ^1H e ^{13}C .

Para a obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , cerca de 10 mg das amostras (extrato bruto e partições) foram dissolvidas em solvente (CDCl_3 , D_3COD ou D_3CSOCD_3) adequado de acordo com sua polaridade. Cada amostra foi posta em um tubo de vidro especial (15 x 0,5 mm) e em seguida colocada no probe do espectrômetro de RMN (Bruker Advance 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C ou 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) para receber a sequência de pulso na frequência de ressonância. As escalas de frequência tiveram como padrão de referência o TMS (tetrametil silano). Em alguns casos as amostras passaram por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e comparação de espectros com a espectroteca.

2.4 Eletroforese Capilar (EC)

Todos os extratos brutos e as frações dos extratos metanólicos da parte aérea de *B. humidicola* foram analisados por Eletroforese Capilar (EC), utilizando-se o protocolo para a detecção de compostos fenólicos (SANTOS, et al., 2007; SANTOS, et al., 2011). A fim de se confirmar a presença dos compostos foi adicionado um mix de padrões com cinco ácidos fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico). Embora essa metodologia possa quantificar os fenólicos existentes nas amostras, nesse trabalho objetivou-se apenas sua detecção.

2.4.1 Instrumentação e reagentes para EC

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar (EC) sistema MDQ CE (Beckman Coulter, EUA), equipado com detector espectrofotométrico de UV, conectado a um sistema para aquisição de dados. O comprimento de onda de detecção selecionado foi de 214 nm. Separações foram realizadas em capilares de sílica fundida não revestidos obtidos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, U.S.A). As dimensões do capilar foram: 75 μm de diâmetro interno e 60,0 cm de comprimento total (52,0 cm até o detector), a temperatura de 25°C. As amostras e padrões foram introduzidos no sistema por injeção hidrodinâmica (0,5 psi/5s). A tensão aplicada para a separação foi de 20 kV e a solução de 20 mM de fosfato a pH 6,7 foi utilizada como eletrólito de corrida. As soluções estoque de fosfato de sódio (100 mM) foram preparadas em água deionizada e armazenadas sob-refrigeração.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Os padrões dos ácidos fenólicos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e da Acros Organics (Acros Organics, New Jersey, USA). A água ultra-pura utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O eletrólito (tampão de corrida) fosfato de sódio foi adquirido pelo Mallinkrodt (Paris, Kentucky, France).

2.4.2 Procedimentos analíticos para EC

No início de cada análise, o capilar foi condicionado com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (5 min), seguido de água deionizada (5 min) e eletrólito (30 min). Entre cada corrida o capilar foi reconicionado, geralmente por uma lavagem com a solução de eletrólito. Esse

procedimento foi realizado sob alta pressão por 2 min seguido por lavagem com o eletrólito de corrida por 3 min.

2.4.3 Preparo das amostras para EC

As amostras foram previamente liofilizadas sendo conseguintemente solubilizadas em 5 mL de etanol 95%. As soluções foram processadas no ultrasom por 30 min. Após isso, foram adicionados mais 5 mL de água (5 mg/mL). As amostras foram filtradas em filtro Milex de 0,22 micras em frascos tipo Falcon e guardadas sob refrigeração. No momento da análise foram diluídas 1:1 em etanol.

2.5 Procedimentos de Fracionamento dos Extratos Brutos Metanólicos da Raiz e da Parte Aérea de *B. humidicola*

Após o processo de obtenção de cada extrato bruto, seguiu-se o fracionamento do extrato metanólico tanto daquele obtido das folhas (BHFM) como do obtido das raízes (BHRM). Para fracionamento dos extratos brutos foi utilizada a partição líquido-líquido em funil de separação. A partir do extrato metanólico da raiz e parte aérea, que foram solubilizados em uma solução de metanol água 7:3, o fracionamento foi realizado com solventes de menor polaridade como hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B). O filtrado foi recolhido e posteriormente concentrado em rotavapor. Os rendimentos das partições estão mostrados no fluxograma abaixo (Figura 3). Todas essas frações foram avaliadas quanto ao seu efeito na germinação das espécies *Lactuca sativa*, *Macrotyloma axillare* e *Calopogonium mucunoides*.

Dentre todos os extratos brutos que foram avaliados em função da germinabilidade das sementes das espécies receptoras, optou-se pela exploração química do extrato metanólico. Para tal, a escolha dessa amostra foi de acordo com os dados referente aos trabalhos com braquiária, incluindo a *B. humidicola*, que indicam essa fração como a que mais contém aleloquímicos. Além disso, a literatura indica a parte aérea (SOUZA-FILHO, 1995) e a raiz (RAO, 1990) como as partes da planta que contém a maior quantidade de componentes químicos com ação alelopática.

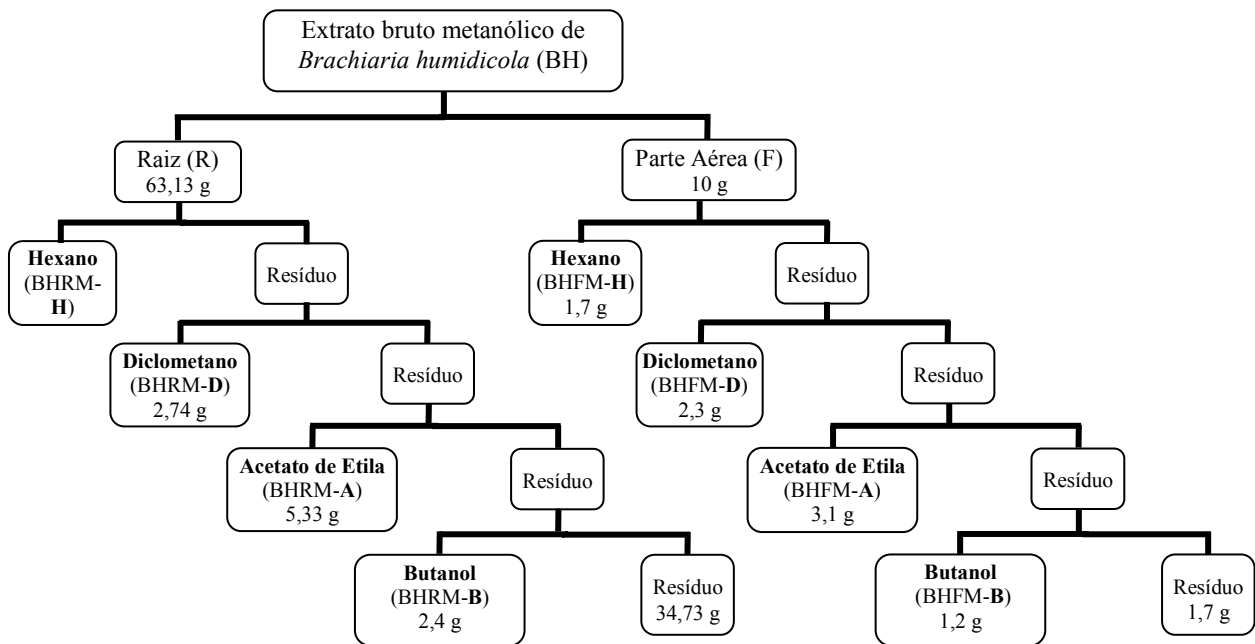


Figura 3. Esquema de fracionamento com solventes orgânicos com polaridades crescentes dos extratos brutos metanólicos de raiz e parte aérea de *B. humidicola*.

2.6 Bioensaio de Atividade Alelopática

A avaliação da atividade alelopática de *B. humidicola* foi realizada em laboratório com experimentos de germinação, avaliando a capacidade de inibir ou estimular a germinação de sementes de espécies receptoras (SOUZA-FILHO et al., 2010).

2.6.1 Espécies receptoras

As espécies receptoras foram *Lactuca sativa* L. (alface), que é comumente utilizada como planta indicadora de atividade alelopática, por ser sensível aos metabólitos secundários (ALVES et al., 2004). As espécies forrageiras foram as leguminosas tropicais *Stylosanthes* ssp. O. Swartz (*S. macrocephala* M. B. Ferreira & Sousa Costa e *S. capitata* Vog), *Calopogonium mucunoides* Desv., *Macrotyloma axillare* (E. Mey.) Verdc. e *Desmodium heterocarpon* (L.) subsp. *ovalifolium* (Prain) H. Ohashi recomendadas para o uso em consórcio com pastagens de gramíneas. As sementes das leguminosas foram obtidas da EMBRAPA Agrobiologia, em Seropédica no estado do Rio de Janeiro, Brasil. As sementes de alface foram obtidas de empresa comercial idônea. Todas as sementes foram armazenadas em câmara fria a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ até sua utilização nos testes de germinação. A escolha das leguminosas forrageiras testadas baseou-se principalmente no potencial forrageiro (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010).

2.6.2 Extratos brutos, frações e padrões para teste de atividade alelopática

Foram realizados experimentos avaliando todos os extratos brutos de *B. humidicola* sobre a germinação das espécies receptoras. As frações do extrato bruto metanólico de raiz e

parte aérea foram avaliadas sobre *L. sativa*, *M. axillare* e *C. mucunoides*. Na figura 4 está apresentado o esquema das espécies receptoras e as respectivas soluções avaliadas. Com base na literatura, que confere aos fenólicos uma alta atividade fitotóxica (EINHELLIG, 1986; SOUZA-FILHO et al., 2010; ALMAGHRABI, 2011), foram testados os derivados dos ácido cinâmico (Figura 5) e benzóico (Figura 6) sobre *L. sativa*, *M. axillare* e *D. ovalifolium*. Todas as substâncias testadas foram com base na detecção de compostos similares nos extratos de *B. humidicola* obtidos nesse trabalho ou com base na literatura. Os testes de germinação foram realizados sob a aplicação das soluções:

1. Extratos brutos das partes (raiz, parte aérea e semente) de *B. humidicola*;
2. Frações do extrato bruto metanólico da parte aérea e de raiz;
3. Padrões de ácidos orgânicos, sendo eles os derivados do ácido cinâmico (a forma *trans* dos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico) e do ácido benzoico (ácidos *p*-hidroxibenzóico, gálico, protocatequico e vanílico);
4. Mix de flavonóides (MF), sendo eles quercetina, rutina, canferol e canferol 3-*o*-ranminosídeo;
5. Mix de flavonóides (MF) mais ácido *trans*-cinâmico (ACT);
6. Ácido *trans*-cinâmico (ACT);
7. Saponina (S1) isolada a partir da fração 26 de BHRM-A (117-119);
8. Saponina (S2) isolada a partir da fração 26 de BHRM-A (120-124);
9. Hesperidina (flavonóide) puro.

De maneira indireta, as soluções 4, 5 e 6 foram testadas com o intuito de detectar a ocorrência de antagonismo ou sinergismo entre as substâncias contidas nos extratos de *B. humidicola* com reflexo nas espécies receptoras (VOKOU et al., 2003). Tanto a hesperidina como os outros flavonóides (Figura 7) foram testados por apresentarem semelhança ao flavonóide isolado a partir de extratos da parte aérea e da raiz de *B. humidicola*.

A partir da fração 26 obtida pelo fracionamento em acetato de etila do extrato metanólico de raiz (Figura 3) foi isolada uma mistura de saponinas provindas da subfrações que vão de 117-119 (S1), e de 120-124 (S2). A atividade alelopática de ambas as misturas de saponinas contida em S1 e S2 foram testadas sobre as espécies receptoras *L. sativa* e *M. axillare*.

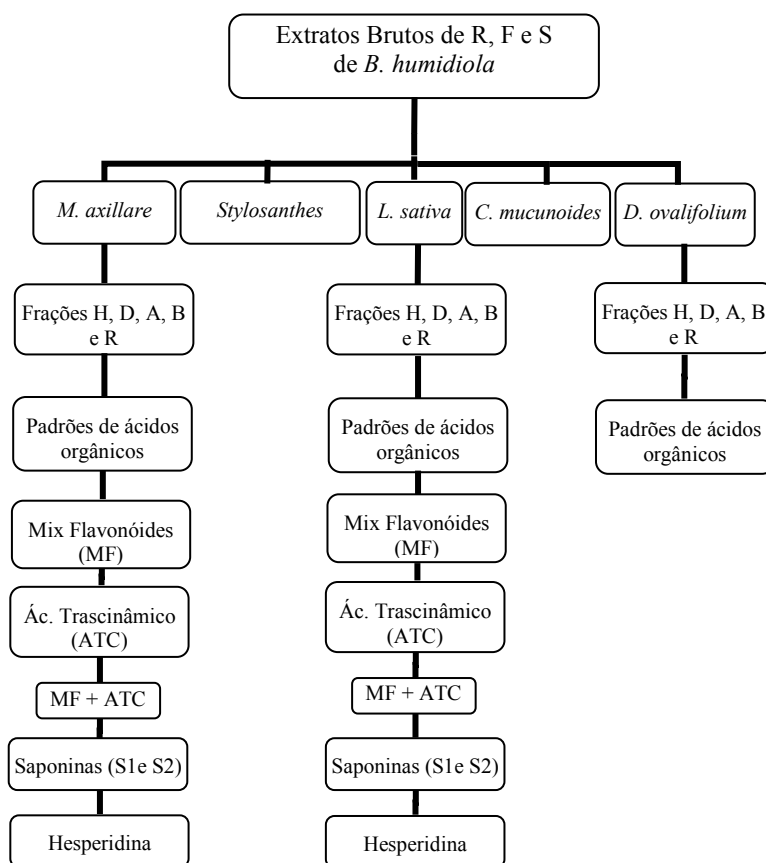


Figura 4. Esquema das espécies e soluções testadas por espécie. Extrato Bruto de Raiz= R; Parte Aérea= F; Sementes= S; Frações de Hexano=H; Diclorometano= D; Acetato de Etila= A; Butanol= B e Resíduo= R.

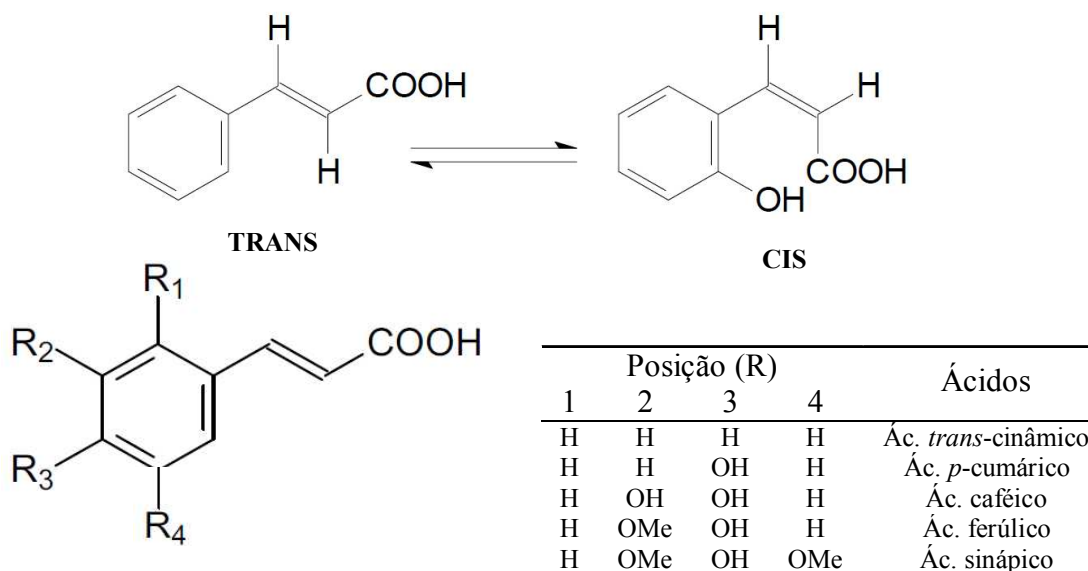
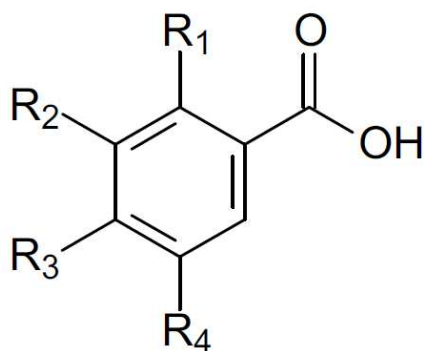
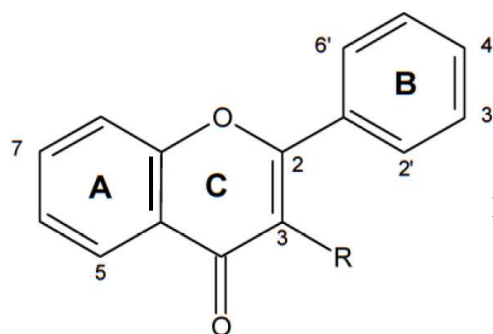


Figura 5. Ácido cinâmico e seus derivados.
H= Hidrogênio; OH= Hidroxila; OMe= Metoxila.



Posição (R)				Ácidos
1	2	3	4	
H	H	H	H	Ác. benzóico
H	H	OH	H	Ác. <i>p</i> -hidroxibenzóico
H	H	OH	OH	Ác. protocatequico
H	OH	OH	OH	Ác. gálico
H	OMe	OH	H	Ác. vanílico

Figura 6. Ácido benzóico e seus derivados.
H= Hidrogênio; OH= Hidroxila; OMe= Metoxila.



Esqueleto Flavonoide

R	Posição							Flavonoide
	5	6	7	8	3'	4'	5'	
O-Gli-6-Ram	OH	H	OH	H	OH	OH	H	Rutina
OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	Quercetina
OH	OH	H	OH	H	H	OH	H	Canferol
Ram	OH	H	OH	H	H	OH	H	Canferol 3-a-raminosídeo
H	OH	H	O-Gli-Gli	H	H	OMe	OH	Hesperidina

Figura 7. Flavonoide e seus derivados. Gli= Glicose; Ram= Ramnose.

2.6.3 Bioensaio de germinação

As sementes das espécies receptoras foram selecionadas e previamente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Aquelas espécies com necessidade de ter sua dormência quebrada passaram por processo de tratamento (Tabela 2), segundo as recomendações da Regra para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009).

Para os extratos brutos foram utilizadas soluções na concentração de 1%; já para as frações de extrato bruto metanólico de raiz e parte aérea, a concentração foi de 0,5% (SOUZA-FILHO et al., 2005). Nos testes com os padrões as soluções foram preparadas a concentração de 5 mg L⁻¹ (SANTOS et al., 2011). No caso dos testes da solução contendo uma mistura de quatro padrões de flavonóides (rutina, quercetina, canferol e canferol 3-a-

ramnosídeo), a concentração foi $1,25 \text{ mgL}^{-1}$ para cada substância. Para o teste da solução do mix de flavonóides mais o ác. *trans*-cinâmico, foram adicionados $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ de cada um.

Todas as amostras foram solubilizadas em água destilada e deionizada, exceto aquelas obtidas a partir do hexano, que foi eluído com a mesma quantidade em diclorometano, razão pela qual foi utilizado controle para esse solvente. Para efeito de comparação da resposta germinativa, para cada espécie foi utilizado um controle com a aplicação de água pura. No caso dos testes das amostras solúveis em diclorometano foram utilizadas placas de petri de vidro (9,0 cm de diâmetro), enquanto que as solubilizadas em água foram adicionadas em caixas plásticas transparentes (dimensões $11 \times 11 \times 3 \text{ cm}$) denominadas gerbox.

Cada recipiente continha três folhas autoclavadas (120° C) de papel filtro Whatman nº 06. O equivalente a 5 mL e 3 mL de solução foram adicionados em gerbox e placa de petri, respectivamente. Após o preparo de cada recipiente, 25 sementes por recipiente por repetição de cada espécie foram adicionadas, o que no caso das amostras em diclorometano foi feito após evaporação do solvente. As quatro repetições de cada tratamento foram acondicionadas em um saco plástico que e em seguida foram postas em câmara de germinação (BOD) por um período específico a espécie alvo (item 2.6.1) (BRASIL, 2009). Essas especificações, assim como, as condições de temperatura e fotoperíodo adequados para cada espécie estão demonstradas na tabela 2.

Para o estudo da germinação sob a aplicação dos extratos brutos, as contagens foram realizadas em duas épocas específicas à planta receptora (Tabela 2). Na figura 8 estão apresentados os resultados do teste de germinação com a adição de água (controle) e do extrato bruto hexânico sobre as sementes de *Lactuca sativa*. Após serem contabilizadas, as plântulas normais foram retiradas do recipiente e os dados foram convertidos em porcentagem (BRASIL, 2009).

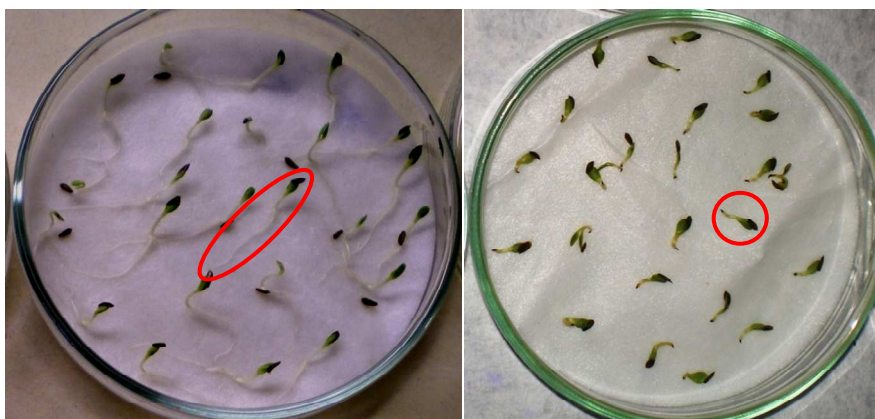


Figura 8. Germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) no terceiro dia de avaliação (tratamento à esquerda controle e à direita BSHH).

Tabela 2. Métodos de quebra de dormência, temperatura de incubação e duração do fotoperíodo para os bioensaios de alelopatia com alface (*L.sativa*) e quatro leguminosas tropicais, sob a aplicação de extratos brutos de *B. humidicola*.

Species	Método de quebra de dormência ⁽¹⁾	Temperatura de incubação ⁽²⁾ (°C)	Fotoperíodo ⁽³⁾ (h)	Leituras dias ⁽⁴⁾	
				1°	2°
<i>Lactuca sativa</i>	-	20	16	03	07
<i>Macrotyloma axillare</i>	Remoção da cutícula	25	8	04	10
<i>Calopogonio mucunoides</i>	-	25	0	03	10
<i>Stylosanthes spp.</i>	Água a 80°C	35	0	04	10
<i>Desmodium ovalifolium</i>	Escarificação	25	8	07	21

⁽⁴⁾ 2° último dia de leitura.

(1), (2), (3), (4) De acordo com Brasil (2009).

A germinação das espécies receptoras (Figura 4) que receberam a aplicação das amostras: MF, MF+ATC, ATC, Hesperidina, Saponina (S1) e Saponina (S2), foi monitorada em intervalos de 24 horas nos três ou quatro primeiros dias após a implantação do experimento. Após esse período, as leituras ocorreram ao final do tempo relativo a cada espécie. As sementes foram consideradas germinadas quando houve a protrusão de uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios (FERREIRA & BORGHETTI 2004).

2.7 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados de germinação foram expressos em percentagem (%) e transformado em arco sen $\sqrt{\% / 100}$ para assegurar a normalidade dos resíduos (NETER et al., 1985). Depois de processado, os dados foram analisados por procedimentos estatísticos do SAS - Sistema de Análise Estatística (SAS, 2002). O GLM PROC foi utilizado para a análise de variância (ANOVA), o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo as médias dos dados foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação das Classes de Metabólitos Especiais nos Extratos Brutos

3.1.1 Análise dos extratos brutos da parte aérea de *B. humidicola*

Embora existam trabalhos sobre o isolamento de substâncias de plantas do gênero *Brachiaria* assim como testes de alelopatia com extratos brutos e frações, com relação a prospecção fitoquímica, não foram encontrados trabalhos para a comparação dos dados obtidos neste trabalho. Os resultados do ensaio fitoquímico (qualitativo) referente a prospecção dos extratos brutos da parte aérea de *B. humidicola* são apresentados na tabela 3. Essa técnica foi utilizada com o intuito de detectar 10 grupos de metabólitos secundários nas amostras. Adicionalmente, para confirmar a presença de algumas substâncias foram realizados os procedimentos físicos utilizando-se análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H e/ou ^{13}C) (Tabela 3). As informações obtidas por esta RMN podem ser consideradas de maior acurácia, uma vez que na prospecção fitoquímica podem ser obtidos resultados com aspectos de difícil interpretação ou mascarados pela coloração. Mesmo assim, a prospecção é muito utilizada preliminarmente como guia para o isolamento de substâncias, uma vez que fornece uma visão geral, quanto à química das espécies vegetais. Neste trabalho esta metodologia proporcionou uma informação geral do perfil químico de todas as partes de *B. humidicola*.

Embora em alguns casos a prospecção indique a ausência de determinados metabólitos não significa que os mesmos não possam ser detectados utilizando-se outras técnicas analíticas. Exemplo disso é o caso dos flavonoides e os alcalóides que foram detectados em menor grau quando comparado com os outros compostos. No entanto, com o auxílio de análises de RMN foi possível detectar a presença de flavonoides no extrato de BHFMA. Dessa forma, a aplicação desta técnica se torna indispensável não somente à determinação estrutural, mas também para complementar métodos de prospecção. É interessante observar que os flavonoides constituem uma importante classe de metabólitos presentes, em plantas superiores, agindo com várias funções ecológicas (CONN, 1981).

Na literatura, os compostos fenólicos, como os derivados do ácido cinâmico, são tidos como os principais responsáveis pelos efeitos alelopáticos (PROKSCH et al., 1985; WEIR et al., 2004). Dentro da prospecção fitoquímica, não há um teste específico para detecção dos ácidos cinâmicos, porém como estes são ácidos orgânicos, sua presença fica implícita no resultado desse grupo químico. Na literatura foram encontrados apenas dois resultados que apontam o ác. *p*-cumárico (Figura 5) como o grande aleloquímico isolado da parte aérea de *B. humidicola* (PEREIRA, 2003; SOUZA-FILHO et al., 2005). Ambos foram isolados a partir do extrato bruto hidrometanólico e identificados com o auxílio das análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Em se tratando do grupo químico dos ácidos orgânicos, é interessante observar que na amostra obtida por extração em hexano sua presença somente foi confirmada pela técnica de RMN. Entretanto esse resultado não é garantido, uma vez que a função fenol aumenta a polaridade da substância, podendo não ser solúvel neste solvente.

No uso da ferramenta RMN os espectros revelaram sinais idênticos ao extrato BHRM, tendo a mesma predominância em carboidratos e afirmando primariamente a presença de sacarose.

De uma forma geral, os extratos dos extremos, ou seja, o mais apolar (BHFH) e mais polar (BHFA) foram os que apresentaram resultados menos expressivos em termos de confirmação dos testes de prospecção fitoquímica, mas os espectros de RMN foram bem informativos (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da parte aérea (F) de *B. humidicola*.

Metabólito Secundário	Extrato Bruto							
	BHFH		BHFH		BHFMA		BHFA	
	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H
Ácidos orgânicos	-	++	++		++		-	
Carboidratos	-		++	++	++	+++	-	++
Alcaloides	-		-		+		+	
Esteroides e triterpenos	+++	++	++	++	+	+	-	
Flavonoides	-		-		-	++	-	++
Saponinas	-		-	++	+++	++	+	++
Taninos	-		-		+	+	+	
Aminoácidos	-		++		++	+	+++	

(+++) presença grande; (++) presença notável; (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. BH= *B. humidicola*; F= Parte aérea; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol água e A= Água.

3.1.2 Análise dos extratos brutos da raiz de *B. humidicola*

Para os extratos brutos obtidos das raízes de *B. humidicola* os resultados do ensaio qualitativo de prospecção fitoquímica são apresentados na tabela 4. Assim como na prospecção fitoquímica da parte aérea, os alcalóides tiveram pouca participação nesse extrato, sendo encontrados na amostra obtida pela extração com o solvente metanol. Da mesma forma que nos extratos da parte aérea, os ácidos orgânicos foram confirmados nos extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico de raiz.

Não foram encontrados sinais sugestivos da presença de catequinas, flavonoides, heterosídeos cianogênicos, quinonas, antraquinonas e cumarinas nos extratos brutos obtidos da parte aérea de *B. humidicola*. Análise de frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato obtido com acetato de etila desta parte da planta confirmou a presença de derivados do ácido cinâmico principalmente o ácido cumárico (Anexo 7).

As saponinas, as quais possuem uma grande repercussão em estudos relacionados a fatores antinutricionais e tóxicos para os animais de produção (TOKARNIA et al., 2000; SOUZA et al., 2010a), foram confirmadas nos extratos metanólico e hidrometanólico de raiz, o primeiro tendo sua confirmação pela técnica de RMN.

Tabela 4. Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da raiz (R) de *B. humidicola*.

Metabólito Secundário	BHRH		BHRM		BHRMA		BHRA	
	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H
Ácidos orgânicos	+	+++	++		+		-	
Carboidratos	-		+++	+++	+	+++	-	
Alcaloides	-		+		-		-	
Esteroides e triterpenos	+++	++	+		-		-	
Saponinas	-		+++	+++	+++		-	
Sesquiterpenos e outras lactonas	+++	+	+		-		-	
Taninos	-		-		-		++	
Aminoácidos	-		++		++		++	

(+++) presença grande; (++) presença notável; (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. BH= *B. humidicola*; R= Raiz; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol água e A= Água.

A presença dos esteróides no extrato bruto hexânico foi confirmada pelas duas técnicas e no extrato metanólico somente pela prospecção. Nessa amostra foram identificados o sitosterol e o estigmasterol (Figura 9), em mistura com um ácido graxo. Esses compostos fazem parte dos grupos dos terpenos, considerado a maior classe de metabólitos oriundos do metabolismo secundário das plantas. Dentro dessa classe se encontram moléculas com elevada atividade alelopática. Algumas delas são compostos voláteis, podendo ser portanto, perdidas por volatilização. Ao contrário do resultado obtido no extrato da parte aérea, os ácidos orgânicos foram detectados via prova fitoquímica, na amostra hexânica.

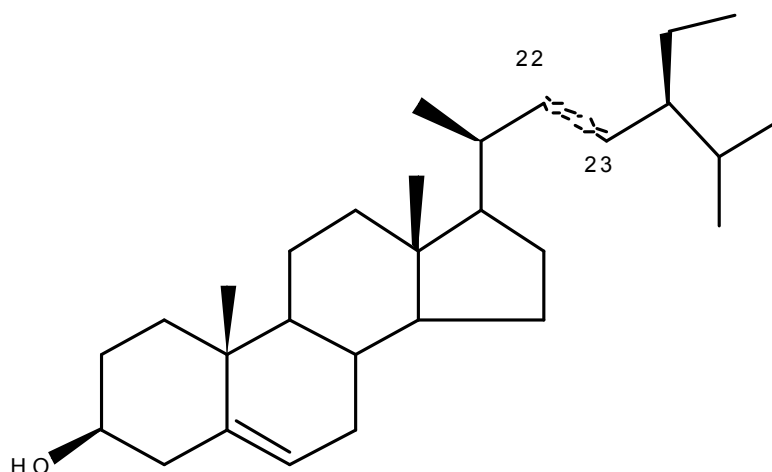


Figura 9. Estigmasterol Δ^{22-23} ; sitosterol 22-23diidro detectados no extrato bruto hexânico após purificação.

Nas frações obtidas a partir do extrato bruto metanólico das raízes que passaram pelos solventes hexano e diclorometano, após serem submetidas a análises de RMN- ^1H , ^{13}C e CG-

EM. Os espectros de massas foram comparados com a espectroscopia e permitiram propor a presença de vários constituintes, como uma mistura de ácidos graxos, um triglicerídeo e outros triglicerídeos insaturados, que através da análise por CG/EM sofreram degradação em ácidos graxos (fração hexânica). Já na fração em diclorometano, além da presença do sitosterol e terpenos, o E-3-hidroxi-1-(3,4-dihidroxifenil)-propeno foi detectado por RMN e por CG/EM (Figura 10).

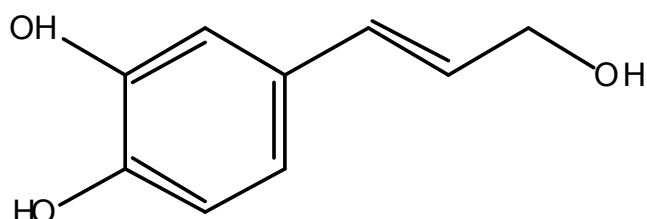


Figura 10. E-3-hidroxi-1-(3,4-dihidroxifenil)-propeno identificado na fração de diclorometano de extrato bruto metanólico da raiz.

Dentro da fração em acetato de etila foram detectados via RMN os flavonoides e a possível presença de outros compostos fenólicos. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiu identificar uma mistura de saponinas, no mínimo de três componentes, entre elas derivados da gitogenina. A comparação com os dados obtidos nos espectros das saponinas encontradas na espécie *Balanites aegyptica* (PETTIT et al., 1991) auxiliou na proposta de estruturas para as saponinas presentes nas raízes da *B. humidicola*. Análises adicionais estão sendo feitas com separação com HPLC para posterior análise com massas com sistema elétron spray para chegar nas estruturas destas saponinas. As figuras 11 A e B mostram os esqueletos básicos destas substâncias. Vale lembrar que na identificação dos constituintes químicos com o auxílio das análises de RMN ^1H (Anexo 8) pode-se considerar que se trata de componentes majoritários. Portanto, os flavonoides glicosilados e as saponinas são os constituintes majoritários em raízes de *B. humidicola*. Essa afirmativa vale para as outras substâncias encontradas.

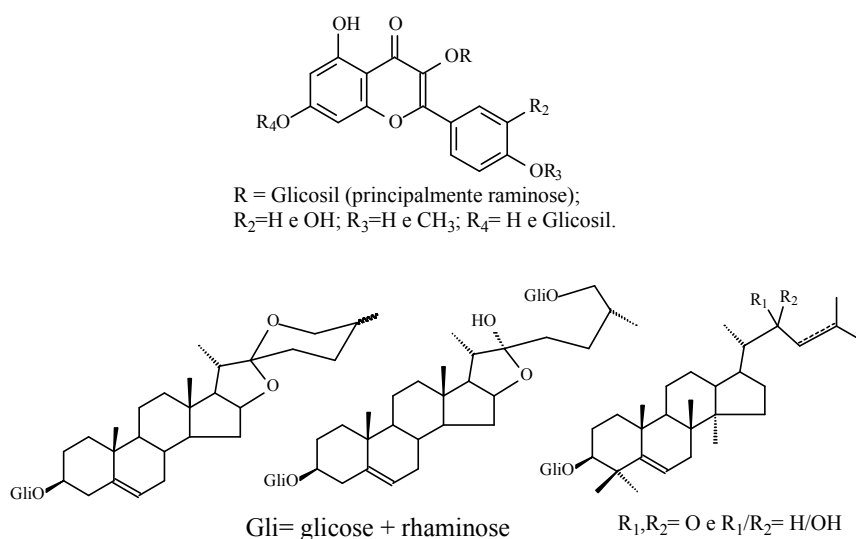


Figura 11. Esqueletos básicos de metabolitos identificados por RMN e em frações obtidas com acetato de etila a partir do extrato metanólico da raiz de *B. humidicola*.

Considerando a detecção das saponinas deve-se salientar que estes compostos possuem diversas implicações, como a intoxicação em animais. Inicialmente, a toxicidade das braquiárias foi associada à presença de um fungo saprófita (*Pithomyces chartarum*), mas foi demonstrado que, pelo menos no Brasil, a intoxicação em ruminantes, ovinos, bubalinos e equinos é causada por saponinas presentes nas folhas das braquiárias (TOKARNIA et al., 2000; BRUM et al., 2007, BRUM et al., 2009; SOUZA et al., 2010a). Além disso, se sabe que estas substâncias tem ação alelopática sobre uma gama de espécies (SOARES & VIEIRA, 2000; GRISI et al., 2011). No estudo realizado por Rodrigues (2002) as saponinas e taninos foram sugeridos como aleloquímicos encontrados em extrato aquoso de folhas de *Myrciaria cuspidata*.

3.1.3 Análise dos extratos brutos da semente de *B. humidicola*

Os resultados do ensaio qualitativo de prospecção fitoquímica dos extratos brutos obtidos das sementes de *B. humidicola* são apresentados na tabela 5.

Para esses extratos, não foram encontrados sinais sugestivos da presença de alcaloides, catequinas, flavonoides, heterosídeos cianogênicos, quinonas, sesquiterpenos e outras lactonas, além das cumarinas.

Apesar do número reduzido de trabalhos quando comparado com pesquisas que investigam a raiz e a parte aérea das plantas, existem estudos que demonstram que as sementes possuem elevado potencial alelopático (SUMAN et al., 2002).

Como pode ser observado nas tabelas, 3, 4 e 5 a maior diversidade e quantidade de substâncias detectadas está presente na parte aérea e nas raízes da planta. Esse resultado corrobora com a revisão feita por SOUZA-FILHO et al. (2011), onde os aleloquímicos isolados a partir de sementes são mais raros quando comparados com as folhas ou de plantas inteiras. Resultados semelhantes também foram encontrados por outros autores (SOUZA FILHO et al, 1997; SOUZA FILHO at al., 2005; SANTOS et al., 2008).

Tabela 5. Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) dos extratos brutos da semente (S) de *B. humidicola*.

Metabólito Secundário	BHS *		BHS M		BHS MA		BHS A	
	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H	Prosp	RMN ^1H
Ácidos orgânicos	-	++	+		++		-	
Carboidratos	-		-		-	+	-	
Esteroides e triterpenos	+++		-		-		+++	
Saponinas	-		-		+		-	
Taninos	-		-		+++		-	
Aminoácidos	-		++		+++		-	

(+++) presença grande; (++) presença notável; (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. BH= *B. humidicola*; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol água e A= Água.*Principais componentes descritos acima.

A análise por RMN permitiu identificar com segurança uma mistura de ácidos e ésteres graxos, tendo triglicerídeos com ácidos insaturados como representados abaixo (Figura

12), além da identificação da alantoína e açúcares nos extratos mais polares. A presença destes metabólitos é confirmada pelos anexos 6 a e b.

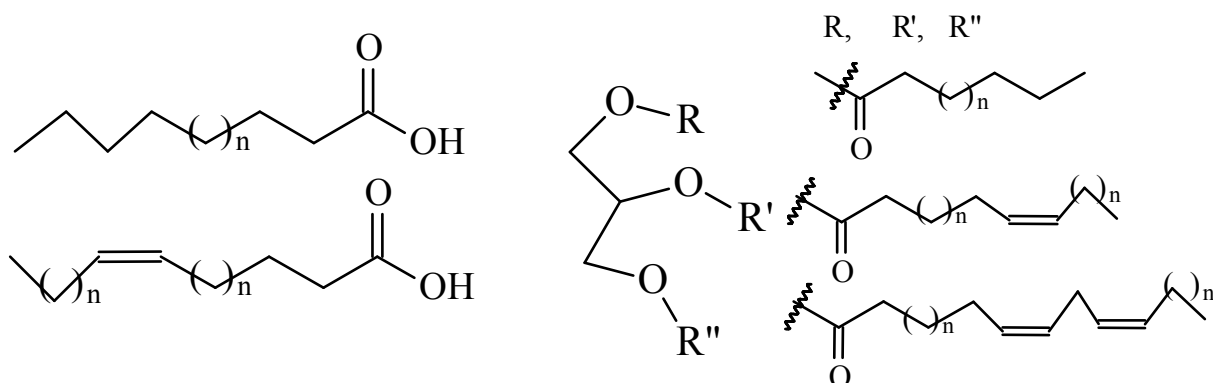


Figura 12. Esqueletos básicos de metabólitos identificados por RMN no extrato de semente de *B. humidicola*.

3.2 Estudo das Frações Obtidas do Extrato Bruto Metanólico da Parte Aérea

Após os primeiros resultados da abordagem fitoquímica dos extratos brutos, fez-se a opção de realizar o fracionamento do extrato bruto da parte aérea, uma vez que há consideráveis evidências na literatura atribuindo à parte aérea das plantas, incluindo *B. humidicola*, a maior quantidade de aleloquímicos presentes. Por esta razão, foi realizada, sua prospecção fitoquímica e o teste de germinabilidade sobre algumas espécies receptoras.

Os resultados observados para o fracionamento do extrato bruto metanólico da parte aérea são apresentados na tabela 6. Em contraponto aos resultados da abordagem fitoquímica dos extratos brutos da parte aérea, observou-se que após a primeira etapa de purificação, a presença de flavonoides foi positiva. Já os alcaloides tiveram essa projeção em menor proporção, porém sendo maiores que no BHFA.

Análises de espectros de RMN ^1H e ^{13}C de frações do BHFM-A confirmaram a presença do flavonoide 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona (Figura 13), em mistura com outros flavonoides (Anexo 4) além de grande quantidade de carboidratos como pode ser observado no anexo 3.

Tabela 6. Resultados dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp) com o auxílio da Ressonância Magnética Nuclear 1H (RMN¹H) das frações obtidas a partir do extrato bruto metanólico da parte aérea (F) de *B. humidicola*.

Metabólito Secundário	BHFH-H		BHFH-D		BHFH-A		BHFH-B	
	Prosp	RMN ¹ H	Prosp	RMN ¹ H	Pros p	RMN ¹ H	Prosp	RMN ¹ H
Ácidos orgânicos	0	++	0	++	+	+	+	
Carboidratos	-		-	++	0		+++	++
Alcaloides	0		0		0		++	
Esteroides e triterpenos	-		0	+	0	++	0	
Flavonoides	+		0	++	+	+	++	++
Saponinas	0		-		++	+++	++	++
Taninos	0		0	++	-		++	
Aminoácidos	+		+		++	+	+++	

(+++) presença grande; (++) presença notável; (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. BHFH= Extrato metanólico da parte aérea de *B. humidicola*; M= Fração em Metanol; H= Fração em Hexano; D= Fração em Diclorometano; A= Fração em Acetato de etila e B= Fração em Butanol.

Após o fracionamento dos extratos da parte aérea de *B. humidicola*, foi identificado o flavonoide glicosilado em mistura com algumas impurezas a partir da fração em acetato de etila (Figura 13, Anexo 4 e 5).

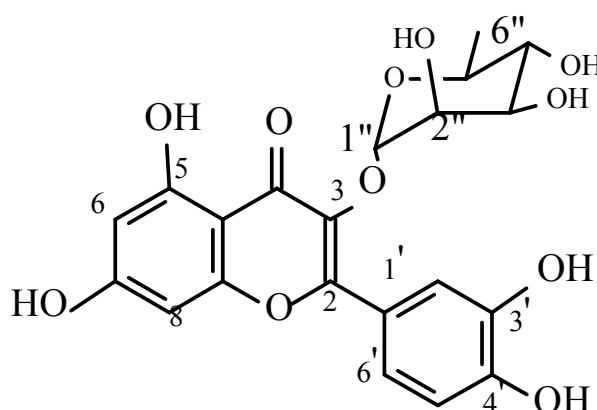


Figura 13. 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona detectado e determinado por RMN a partir das subfrações de acetato de etila oriundo do extrato metanólico da parte aérea de *B. humidicola*, **Anexos 4 e 5**.

3.3 Eletroforese Capilar

Todas as amostras analisadas pela prospecção fitoquímica, assistida por análise com RMN, foram também avaliadas pela técnica de Eletroforese Capilar (EC) para a pesquisa de compostos fenólicos (Figuras 5 e 6). Como visto anteriormente, os compostos fenólicos têm sido amplamente relacionados à atividade alelopática em um grande número de espécies

(JACOB & SARADA, 2012; MITROVIC et al., 2012). Entretanto, pela análise de RMN não foram observados sinais, pelo menos com intensidade significativa, que comprovassem a presença desses constituintes. Um exemplo seriam os dubletos (H- α /H β) com constante de acoplamento em torno de 15 Hz, típicos de sistema *trans*-cinâmicos. Considerando que, os componentes minoritários podem não apresentar sinal no espectro de RMN ^1H e que a análise cromatográfica é mais sensível, sendo capaz de detectar constituintes minoritários, fez-se a análise com EC, resolveu-se fazer esta análise para certificar a possível presença desta classe de metabólito. Não sendo descartada a presença de outros metabólitos com atividade alelopática, como visto a seguir.

Os principais resultados obtidos em eletroforese capilar são apresentados nas figuras 14, 15 e 16, sendo que os demais eletroferogramas são apresentados no item “anexo” deste capítulo.

Dada sua grande importância em pesquisas com alelopatia, esta técnica somente foi utilizada para investigar os compostos fenólicos (JACOB & SARADA, 2012). No protocolo para a detecção das substâncias fenólicas, os compostos secundários utilizados foram escolhidos com base na participação destes em fenômenos alelopáticos descritos na literatura. Baseado nos trabalhos de Santos et al. (2011), a identificação dos compostos secundários nas amostras fez-se mediante a comparação dos tempos de migração com um padrão apropriado, por comparação dos espectros em UV/Vis dos picos obtidos nas amostras com os espectros dos padrões, e por fim, adição de padrão nas amostras a fim de se confirmar a presença e a identidade dos compostos.

Embora em estudos preliminares, os ácidos cinâmicos e seus derivados não puderam ser confirmados precisamente pela prospecção fitoquímica e por RMN, mas nas análises com a EC essas substâncias foram detectadas. Nas amostras BHF M (Figura 14) e na sua fração BHF M -Ac (Figura 16) esses ácidos foram confirmadas com sinais intensos.

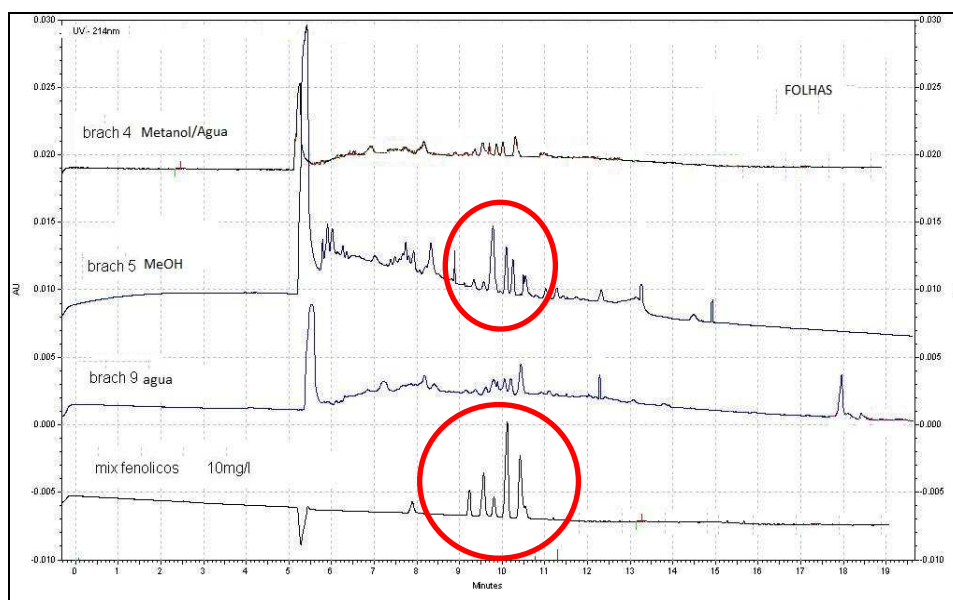


Figura 14. Eletroferogramas dos extratos brutos de parte aérea de *B. humidicola*. Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); brach= extrato bruto da parte aérea; 4= Metanol/Água; 5= Metanol e 9= Água.

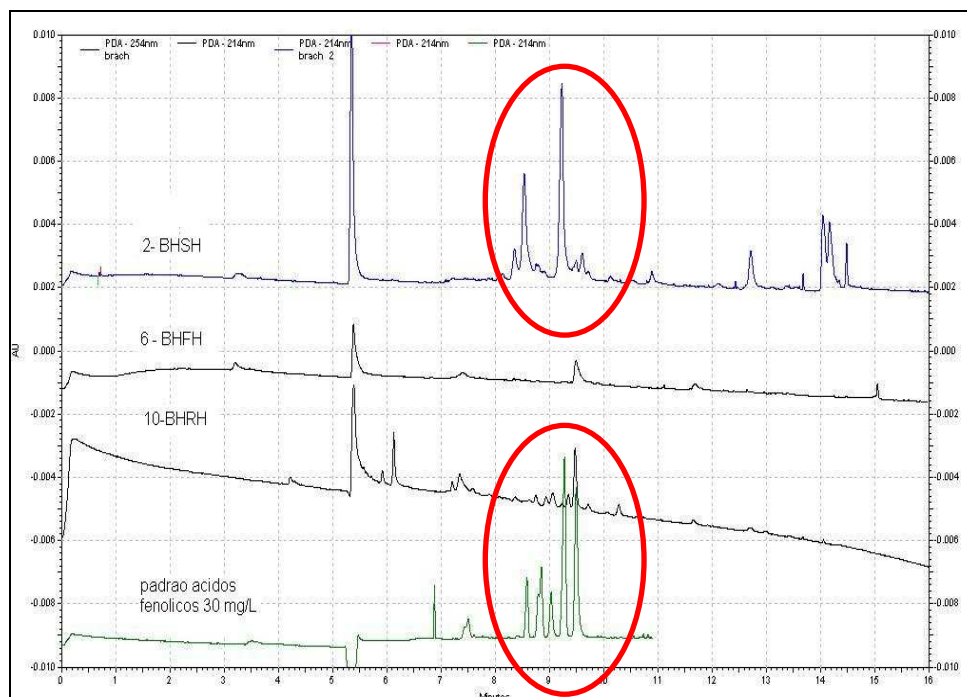


Figura 15. Eletroferogramas dos extratos brutos hexânicos de *B. humidicola*. Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de *B. humidicola*; R= Raiz; F= Parte Aérea; S= semente e H= Hexano. O círculo vermelho destaca os sinais dos padrões (fenólicos) e os sinais similares nas amostras de *B. humidicola*.

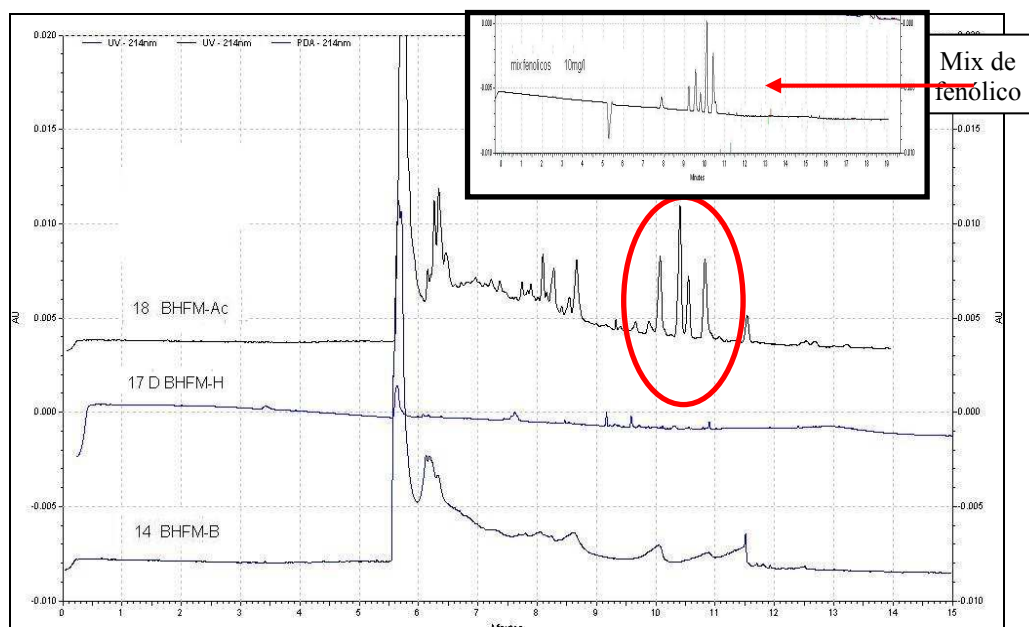


Figura 16. Eletroferogramas das frações obtidas do extrato bruto metanólico da parte aérea de *B. humidicola*. Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BHFM= Extrato da parte aérea de *B. humidicola* Fração Metanólica; Ac= Acetato de etila; H= Hexano e B= Butanol. O círculo vermelho destaca os sinais dos padrões (fenólicos) e os sinais similares nas amostras de *B. humidicola*.

Mesmo sendo detectado com baixa intensidade pelos métodos de prospecção e RMN (Tabela 3 e 6), na fração BHFMA foi possível isolar um flavonoide (Figura 13). A detecção pouco intensa desse flavonoide deu-se, possivelmente devido à sua baixa concentração na amostra avaliada. Na fração obtida em butanol (BHFMB), os fenólicos não foram detectados por EC (Figura 16) concordando parcialmente com os resultados obtidos na prospecção auxiliada por RMN (Tabela 6). É interessante observar que, apesar da baixa intensidade dos cinâmicos na fração butanólica, houve a presença acentuada de flavonoides (Tabela 6) sob técnicas de prospecção e confirmada por RMN. Na interpretação desses resultados pode-se discorrer sobre a hipótese de que a baixa intensidade dos cinâmicos tenha sido uma consequência da sua utilização para a biossíntese de flavonoides, tendo em vista que os fenólicos são precursores dos flavonoides. A presença dos compostos fenólicos e flavonoides no metabolismo vegetal é dinâmica, podendo a planta, em certos momentos (como no florescimento), ou por necessidade de defesa química, direcionar seu metabolismo para síntese de flavonoides a fim de promover a atração de insetos polinizadores. Neste momento fisiológico, é possível que os níveis de ácidos fenólicos estejam bastante reduzidos, podendo não ser detectados dependendo da técnica utilizada. Isso explicaria essas variações na presença dos flavonoides opostamente aos cinâmicos. Tais afirmativas justificam, sempre que possível, a utilização destas práticas/técnicas em conjunto. Entretanto, não se pode deixar de considerar a atividade biológica, que neste caso está associada à inibição da germinação.

Na análise com EC as menores concentrações de ácidos fenólicos foram encontradas no extrato de sementes, enquanto que a maior concentração foi encontrada nos extratos da parte aérea. Provavelmente a maior participação de fenólicos na parte aérea ocorra devido à sua maior exposição, tanto à agressão de patógenos bem como à realizada pelos herbívoros. Vale ressaltar ainda que essas substâncias protegem as células contra as espécies reativas de oxigênio produzidas pela radiação ultravioleta necessária para o processo fotossintético. Esses resultados corroboram a maior atividade alelopática dos extratos foliares observada na literatura (SOUZA-FILHO, 1995).

No espectro de RMN (Figura 17) é possível observar os sinais característicos da presença de flavonoides na fração butanólica do extrato metanólico da parte aérea de *B. humidicola*. O anexo 5 mostra espectro que confirma esta classe de substância em outras frações desta partes da planta.

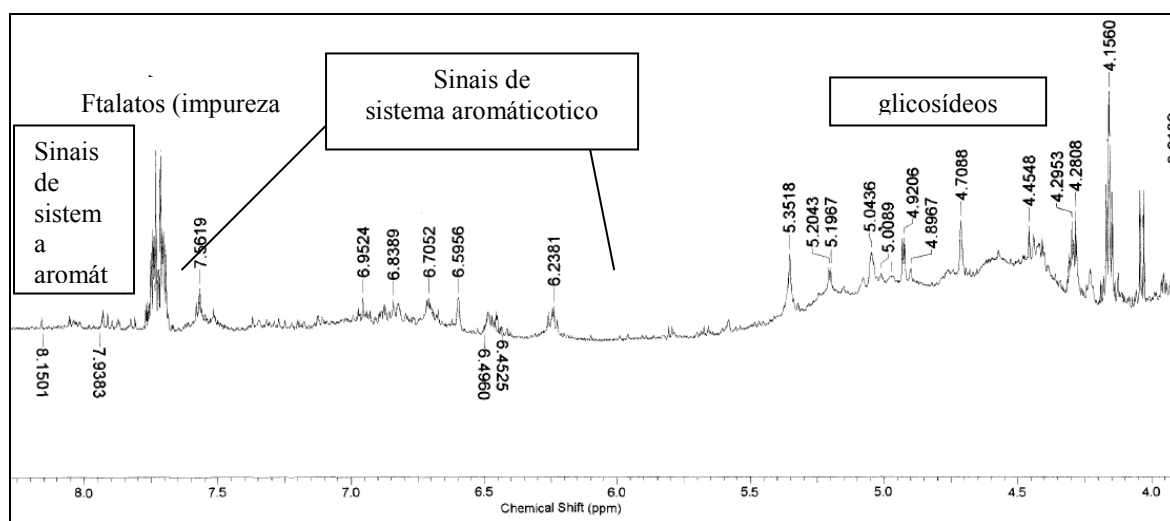


Figura 17. Espectro de RMN demonstrando os sinais característicos da presença de flavonoides na fração butanólica do extrato metanólico da parte aérea de *B. humidicola*.

3.4 Bioensaios de Atividade Alelopática de Extratos Brutos de *B. humidicola*

3.4.1 Extrato bruto da parte aérea

Quanto à avaliação da atividade alelopática, os testes sobre *L. sativa* são apresentados na figura 18. É possível observar que todos os extratos brutos apresentaram efeito inibitório na germinação de alface. Essa elevada inibição obtida para esta espécie, tida como padrão em testes alelopáticos, demonstra que a *B. humidicola* apresenta substâncias bioativas. Quando comparados ao controle, todos os extratos brutos obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de germinação. Para os extratos, somente não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os extratos BHFH e BHFMA, provavelmente devido à similaridade entre as classes de metabólitos presentes em ambos, o que pode ser confirmado nos resultados de prospecção fitoquímica (Tabela 3). Para o extrato BHFA houve um elevado efeito alelopático, sendo observada a inibição total (100%) da germinação das sementes de *L. sativa*. Esses resultados corroboram com os encontrados em literatura, demonstrando que extratos brutos aquosos podem ter um elevado potencial alelopático, principalmente, se esses contiverem ácidos fenólicos solúveis (INOUE et al., 2009; SOUZA-FILHO et al., 2010). Curiosamente, pode-se observar no eletroferograma (brach 9 água) da EC (Figura 14) que, apesar da presença pouco pronunciada de compostos fenólicos, esses estão presentes, o que pode justificar a força de inibição deste composto sobre alface.

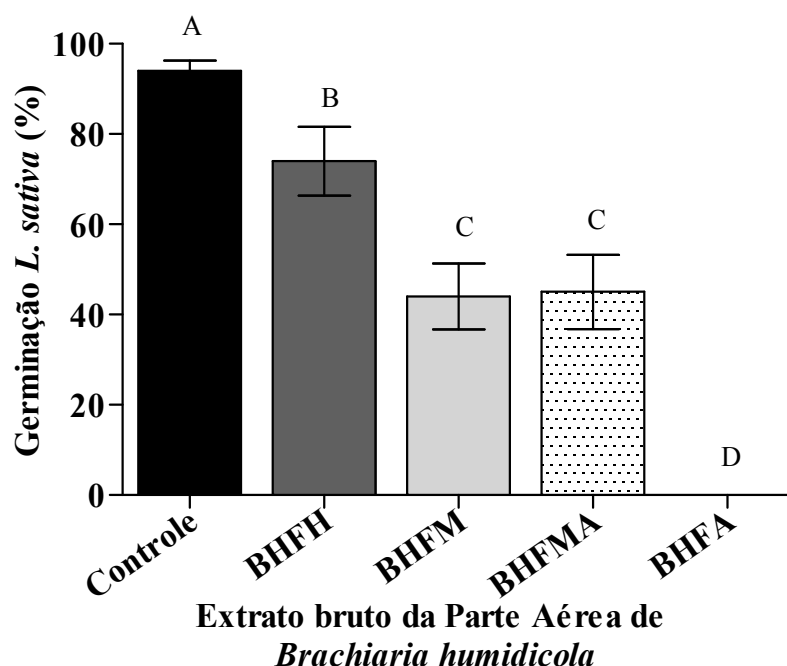


Figura 18. Atividade alelopática de extratos brutos de parte aérea de *Brachiaria humidicola* sobre sementes de *Lactuca sativa* (alface). BH= *B. humidicola*; F= Parte aérea; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na figura 19 estão apresentados os resultados obtidos nos testes de germinação das sementes das leguminosas tropicais *Stylosanthes* spp. (A), *Macrotyloma axillare* (B), *Calopogonio mucunoides* (C) e *Desmodium ovalifolium* (D), sob aplicação dos extratos brutos da parte aérea de *B. humidicola*.

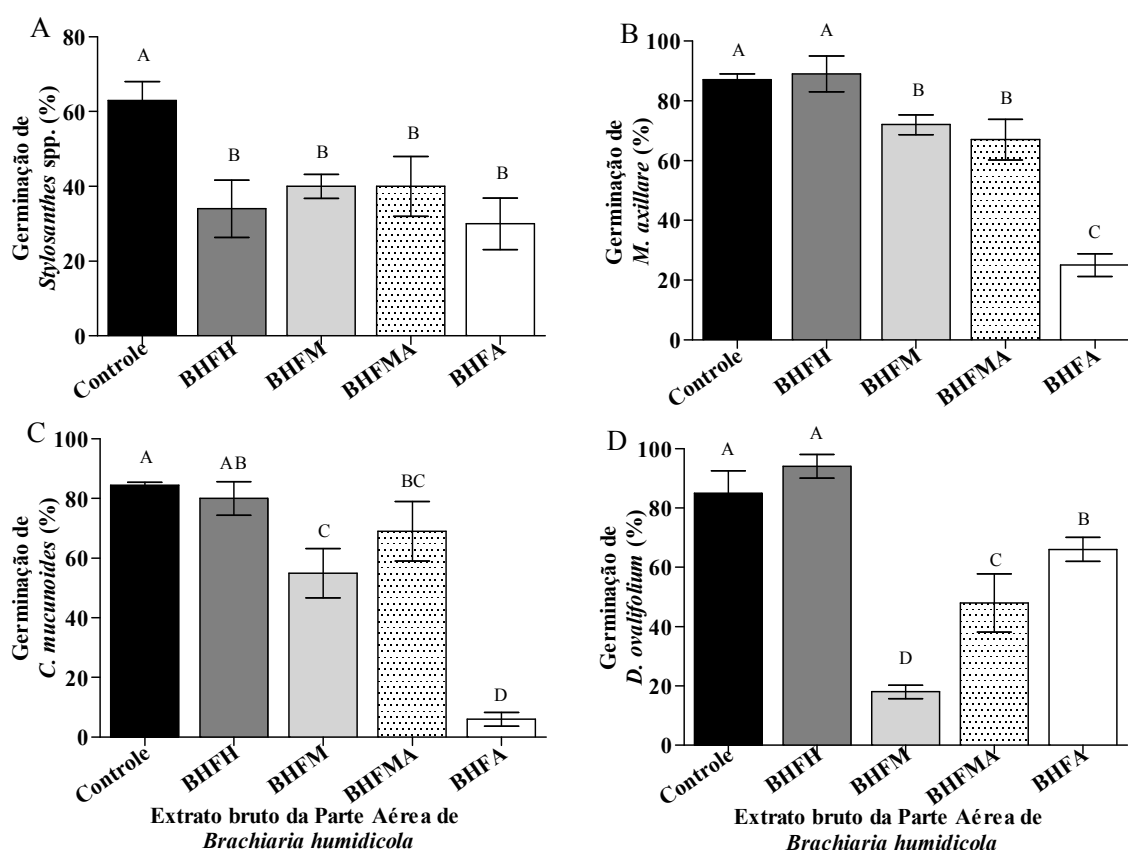


Figura 19. Atividade alelopática de extratos brutos de parte aérea de *B. humidicola* sobre sementes de leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) *Stylosanthes* spp.; B) *Macrotyloma axillare*; C) *Calopogonio mucunoides* e em D) *Desmodium ovalifolium*. BH= *B. humidicola*; F= Parte aérea; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A aplicação desses extratos sobre as espécies receptoras reduziu a germinação em relação ao controle (Figura 19). Em relação aos seus respectivos controles, essa resposta não foi significativa ($P > 0,05$) entre o extrato BHFH de *M. axillare*, *C. mucunoides* e *D. ovalifolium*. Esse resultado é bastante interessante, uma vez que se trata de um extrato que contém moléculas com perfil apolar. Pela prospecção fitoquímica, nesse extrato foram encontrados esteróides, triterpenos e glicosídeos com bastante intensidade, sendo os dois últimos confirmados por RMN (Tabela 3). Já para os ácidos orgânicos, classe onde os ácidos fenólicos podem estar contidos, a prospecção não foi capaz de detectá-los (Tabela 3). No entanto, através de análises por RMN foram confirmados a presença de ácidos, não garantindo se tratar de cinâmicos. Por outro lado, nas análises com a EC esses compostos não foram identificados (Figura 15). Essa pode ser a razão pelo qual não houve nenhuma diferença na porcentagem de germinação das leguminosas receptoras *M. axillare*, *C. mucunoides* e *D. ovalifolium* em relação ao controle (Figura 19), uma vez que os fenólicos, principalmente os cinâmicos, são responsáveis pelo efeito inibitório da germinação de várias espécies. Mesmo no caso de alfaca, a redução da germinação observada para esse extrato foi relativamente menor do que os outros, quando comparado ao controle (Figura 18).

A redução mais proeminente pode ser observada nos resultados com BHFA, onde as espécies *M. axillare* e *C. mucunoides* apresentaram as menores porcentagens de germinação

entre os extratos, sendo que para *M. axillare* e *C. mucunoides* a inibição foi de 58% e 79% em relação ao controle, assemelhando-se aos resultados obtidos com *L. sativa*, onde houve a inibição total (100%) da germinação (Figura 19 B, C e 18, respectivamente). Esse resultado demonstra a elevada sensibilidade dessas espécies ao extrato aquoso de *B. humidicola*, em ambiente controlado. Um extrato aquoso obtido da parte aérea de *B. humidicola* reduziu em quase 50% o alongamento da radícula da planta invasora *Desmodium adscendens* (SOUZA-FILHO et al., 1997).

Os extratos aquosos são os que melhor representam as condições na natureza (SINGH et al., 1989), uma vez que em condições de campo, onde a parte aérea e a liteira estão mais expostas às intempéries como as chuvas, é de se esperar que as substâncias polares sejam liberadas mais facilmente. Por conter moléculas com alta polaridade, o extrato aquoso possui uma vasta diversidade de grupos químicos, como as saponinas, que segundo Grisi et al., (2011) ocasionam danos em raízes de alface. Assim como observado por Grisi et al., (2011), a presença de saponinas e taninos (Tabela 3) também pode estar associada à atividade alelopática da parte aérea.

Embora os ensaios tenham sido realizados em condições de laboratório, os resultados preliminares indicam que a espécie *D. ovalifolium* (Figura 19 D) pode ter vantagem competitiva quando em consórcio com a *B. humidicola*, visto que apresentou menor sensibilidade ao extrato BHFA que as demais espécies, pois, conforme dito antes, sabe-se que, de todos os extratos o que mais se aproxima da realidade encontrada nos ecossistemas de pastagens é o extrato aquoso. Esses resultados concordam com os obtidos por Ribeiro (2006) em ambiente de pastagem estabelecida de *B. humidicola*, onde sob as mesmas condições, o consórcio com *D. ovalifolium* prosperou e o de estilosantes teve sua germinação inibida.

Para a leguminosa receptora estilosantes houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos e o seu respectivo controle (Figura 19 A), mas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes extratos.

3.4.2 Extrato bruto da raiz

Em relação aos testes sobre a espécie padrão (*L. sativa*), os resultados dos extratos brutos obtidos das raízes está apresentado na figura 20.

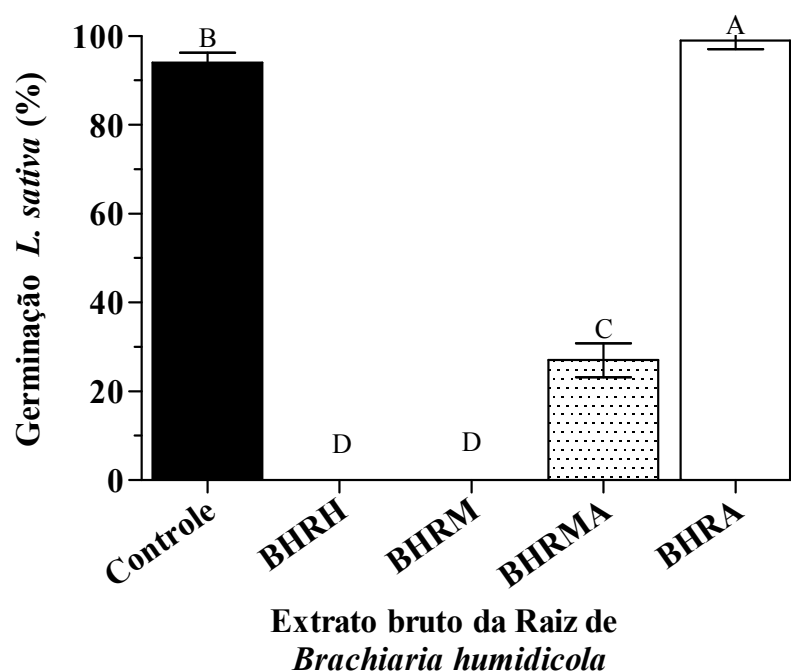


Figura 20. Atividade alelopática de extratos brutos de raízes de *Brachiaria humidicola* sobre sementes de *L. sativa* (alface). BH= *B. humidicola*; R= Raiz; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De maneira inversa ao observado para o extrato bruto da parte aérea, no de raiz se observou uma acentuada diminuição na inibição de *L. sativa* a medida de houve aumento da polaridade (Figura 20). Aparentemente, nesses extratos parece predominar a presença de aleloquímicos principalmente nas porções hexânica e metanólica. Reduções significativas na germinação (0%) de *L. sativa* foram encontradas em resposta aos extratos BHRH e BHRM. No outro extremo, na aplicação do extrato BHRA a inibição da germinação foi estimulada que completamente ($p < 0,05$) em relação ao controle. Conforme Jacob & Sarada (2012) o conceito de alelopatia envolve tanto a inibição quanto a estimulação da germinação. Isso em parte pode ser explicado pela baixa concentração de substâncias químicas detectadas nesse extrato (Tabela 4). Nesse caso pode-se observar a presença notável de aminoácidos e taninos, os quais podem ter inclusive favorecido a germinação (PINHEIRO, et al., 2001).

Os resultados do teste de alelopatia realizado sobre as espécies de leguminosas são apresentados a seguir na figura 21.

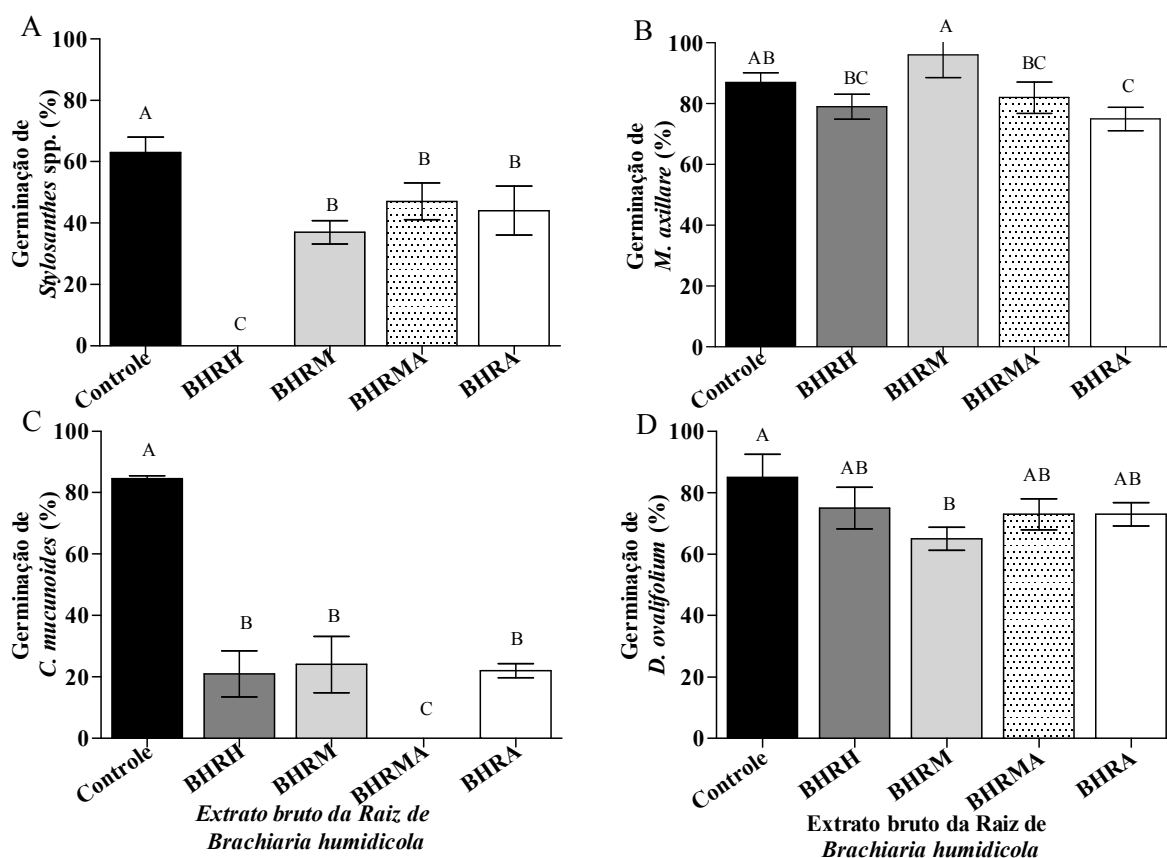


Figura 21. Atividade alelopática de extratos brutos de raízes de *B. humidicola* sobre sementes de leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) *Stylosanthes* spp.; B) *Macrotyloma axillare*; C) *Calopogonio mucunoides* e em D) *Desmodium ovalifolium*. BH= *B. humidicola*; R= Raiz; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos sobre as espécies de leguminosas mostraram que os extratos brutos das raízes de *B. humidicola* influenciaram negativamente a germinação das espécies *C. mucunoides* e *Stylosanthes* spp., havendo inclusive a inibição total com os extratos BHRMA sobre *C. mucunoides* e do extrato BHRH sobre *Stylosanthes* (Figura 21 A e C). Para as leguminosas *M. axillare* e *D. ovalifolium*, apesar da existência de diferenças significativas, as inibições observadas foram bastante suaves. Estes resultados sugerem que as espécies *M. axillare* e *D. ovalifolium* podem apresentar resistência ao aleloquímico presente nas raízes de *B. humidicola*.

3.4.3 Extrato bruto da Semente

Os testes de atividade alelopática sobre *L. sativa* utilizando o extrato bruto obtido das sementes revelaram inibição máxima para o extrato hexânico. Inversamente acompanhado pelo aumento da polaridade dos extratos foi a inibição da germinação dessa espécie receptora (Figura 22).

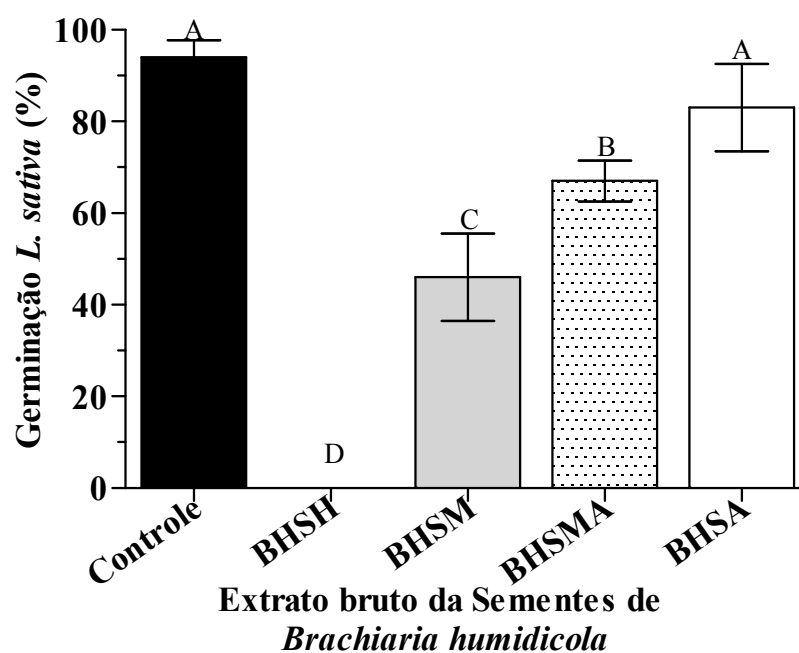


Figura 22. Atividade alelopática de extratos brutos das sementes de *Brachiaria humidicola* sobre sementes de *L. sativa* (alface). BH= *B. humidicola*; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Como pode ser observado na tabela 5 e na figura 15, a presença confirmada de compostos fenólicos pode estar associada às respostas inibitórias por parte da aplicação do extrato BSHH.

Os resultados frente às espécies de leguminosas tropicais são apresentados a seguir na figura 23.

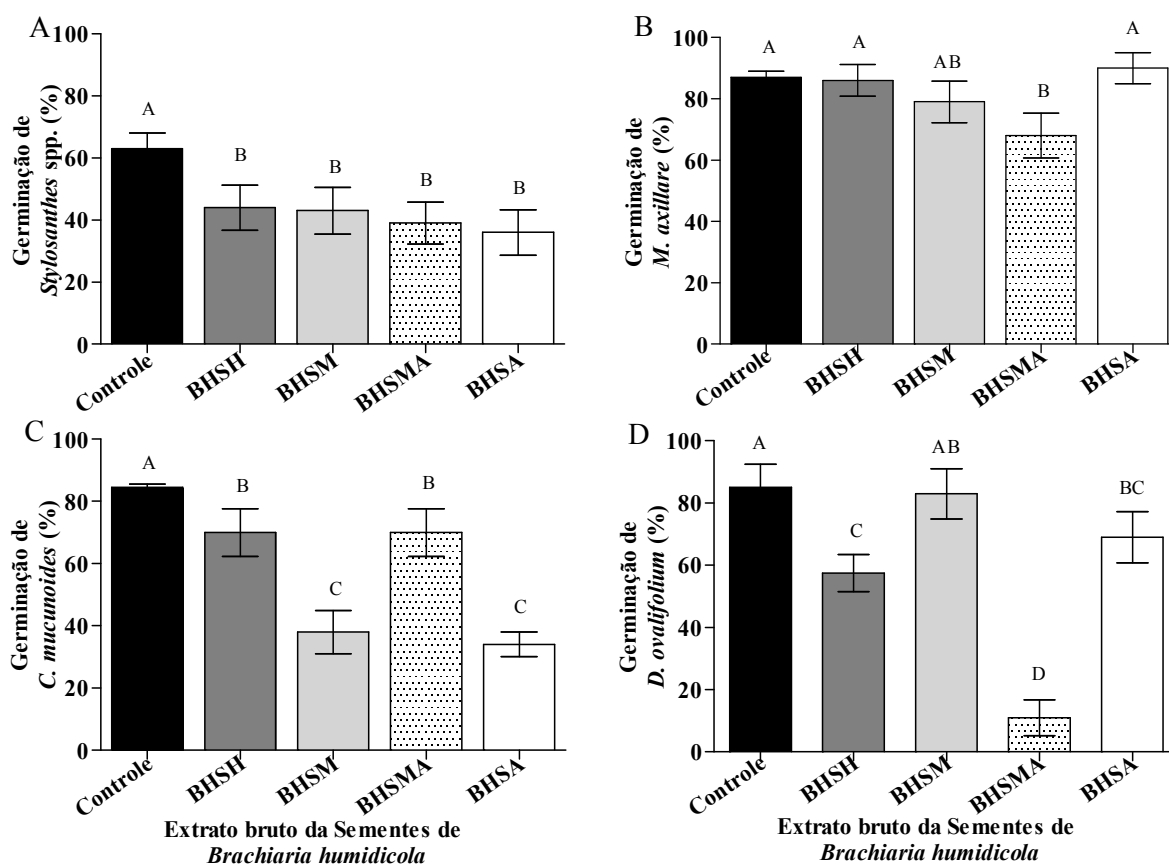


Figura 23. Atividade alelopática de extratos brutos das sementes de *B. humidicola* sobre leguminosas tropicais utilizadas em consórcios de pastagens. A) *Stylosanthes* spp.; B) *Macrotyloma axillare*; C) *Calopogonio mucunoides* e em D) *Desmodium ovalifolium*. BH= *B. humidicola*; S= Semente; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol/Água; A= Água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As leguminosas avaliadas não apresentaram uma tendência de resposta definida em relação a aplicação do extrato bruto de sementes. O extrato que resultou em maior inibição foi o extrato BHSMA quando avaliado sobre *D. ovalifolium*, espécie que apresentou boa tolerância aos demais extratos. Assim como ocorreu com o extrato BSHH em *L. sativa*, o extrato BHSMA também apresentou ácidos orgânicos na prospecção fitoquímica (Tabela 5) e sinais no eletroferograma (Anexo 1).

Considerando a busca por espécies mais tolerantes e adaptadas ao ambiente de consórcio com *B. humidicola*, a espécie *M. axillare* se destacou sob todos os extratos, possivelmente por apresentar boa resistência aos aleloquímicos de *B. humidicola*.

3.5 Frações do Extrato Bruto Metanólico da Parte Aérea e da Raiz

Deste ponto em diante, para focar nesse objetivo, os resultados serão apresentados sobre as espécies que se apresentaram mais promissoras ao ambiente de consórcio.

Na figura 24 podem ser observados os resultados do ensaio de atividade alelopática das plantas receptoras *L. sativa*, *D. ovalifolium* e *M. axillare*, sob a aplicação das frações obtidas a partir do extrato metanólico da parte aérea de *B. humidicola*.

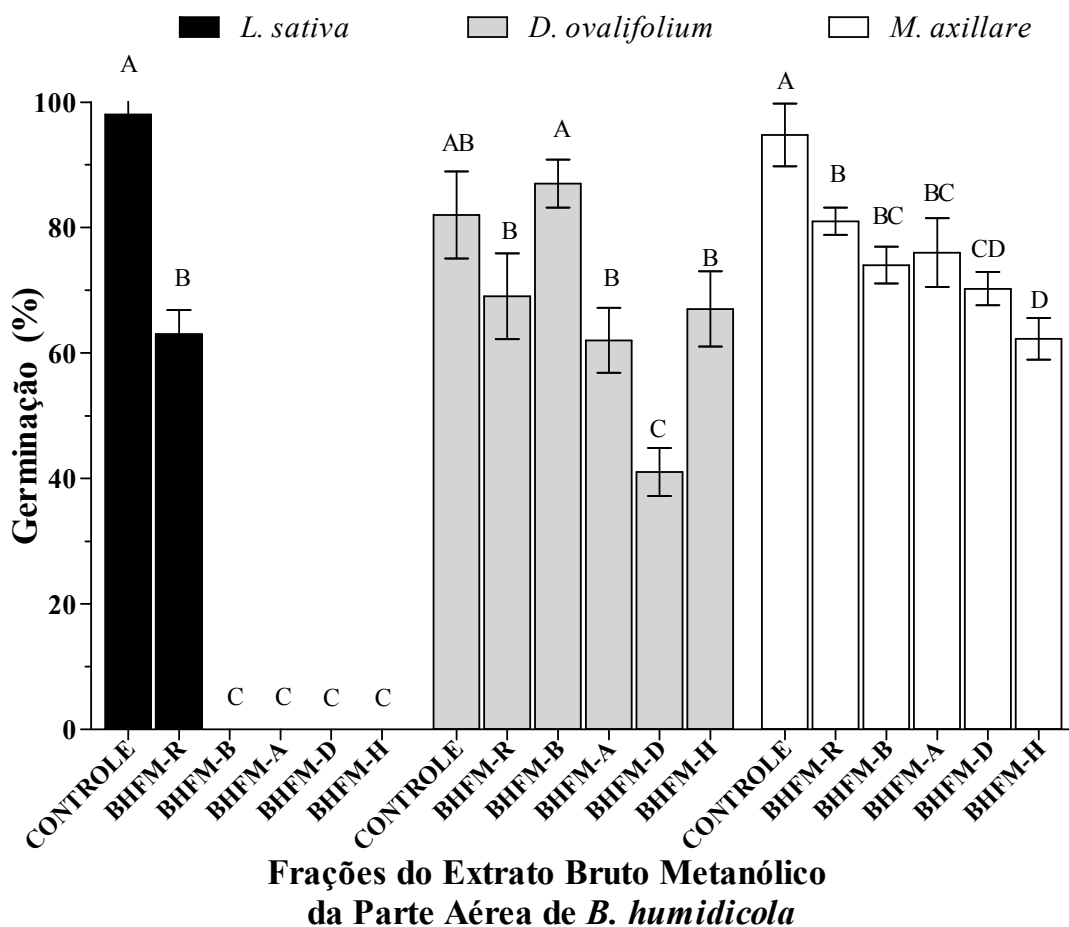


Figura 24. Atividade alelopática de cinco frações obtidas do extrato bruto metanólico da parte aérea de *B. humidicola* sobre sementes de *L. sativa* e duas leguminosas forrageiras. BHFEM= extrato bruto em metanol da parte aérea; Fração H= Hexano, D= Diclorometano, A= Acetato de etila, B= Butanol e R= Resíduo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A espécie *L. sativa* foi 100% inibida por todas as frações, exceto o resíduo que também teve uma inibição significativa em relação ao controle. Possivelmente, tais resultados ocorreram principalmente porque a *L. sativa* é uma planta de alta sensibilidade (ALVES, et al., 2004).

Diferentemente do observado com *L. sativa*, as espécies de leguminosas pré-selecionadas durante a avaliação dos extratos brutos tiveram inibições menos efetivas. Em relação ao desmódio pode-se observar que houve queda na porcentagem de germinação em função da diminuição da polaridade dos extratos, exceto pelas frações butanólica e hexânica. Na tabela 6, onde estão os dados da prospecção assistida com RMN, e na figura 16 (eletroferogramas BHFEM-B, BHFEM-H e BHFEM-Ac) é possível observar uma leve tendência inversa à presença de ácidos orgânicos (compostos fenólicos) e à presença de flavonoides. Em geral, quando aumentamos a presença de compostos fenólicos nos extratos os dados de germinação tendem a apresentar valores mais baixos. O oposto é observado na análise da presença de flavonoides, sendo que quando a presença é maior a porcentagem de germinação também aumenta.

A mesma tendência no aumento da inibição em função da menor polaridade dos extratos foi observada para *L. sativa* e *C. mucunoides* nos ensaios que envolveram avaliação das frações obtidas do extrato bruto metanólico das raízes de *B. humidicola* (Figura 25). Para *M. axillare* e *D. ovalifolium* essa tendência foi inversa, onde esta última teve a taxa de germinação inferior a primeira que, continua sendo a espécie mais tolerante ao extrato de *B. humidicola*.

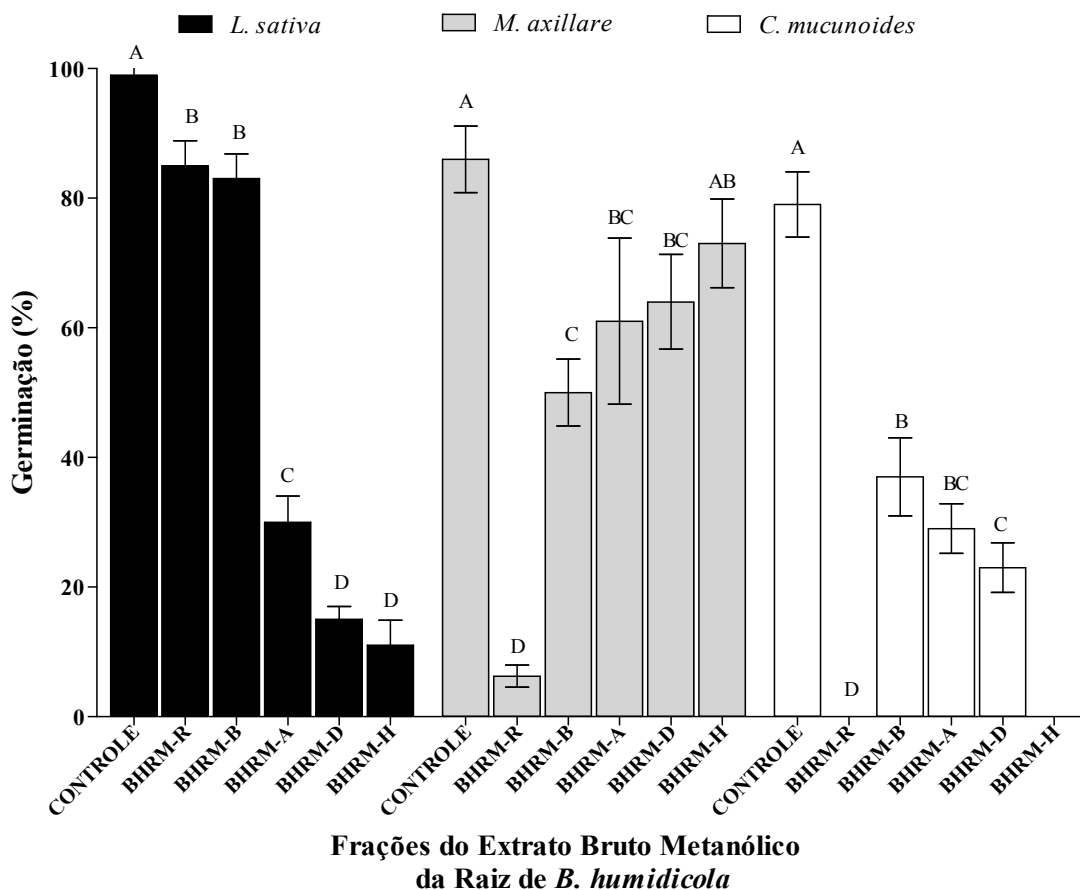


Figura 25. Atividade alelopática de cinco frações obtidas do extrato bruto metanólico da raiz de *B. humidicola* sobre sementes de *L. sativa* e duas leguminosas forrageiras. BHRM= extrato bruto em metanol da parte aérea; Fração H= Hexano, D= Diclorometano, A= Acetato de etila, B= Butanol e R= Resíduo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

3.6 Substâncias Puras

Em vista dos resultados da avaliação dos extratos brutos e das frações de *B. humidicola*, foram realizados ensaios com substâncias puras indicadas como alelopáticas além daquelas na qual fazem parte dos grupos químicos detectados nessas amostras. Foram elas: i) um composto fenólico, o ácido *trans*-cinâmico (ATC); ii) um mix de quatro flavonoides (MF: Rutina, Canferol, Canferol 3-a-ranminosídeo e Quercetina) e iii) MF+ATC. Esse esquema foi montado devido à grande quantidade de informações a respeito da atividade biológica de fenólicos e flavonoides (JACOB & SARADA, 2012; MITROVIC et al., 2012). Além disso, esse grupo de compostos foi confirmado em parte dos extratos avaliados.

Na figura 26 estão apresentados os dados referentes à germinação das sementes de *L. sativa* e da leguminosa forrageira *M. axillare* sob aplicação das soluções supracitadas.

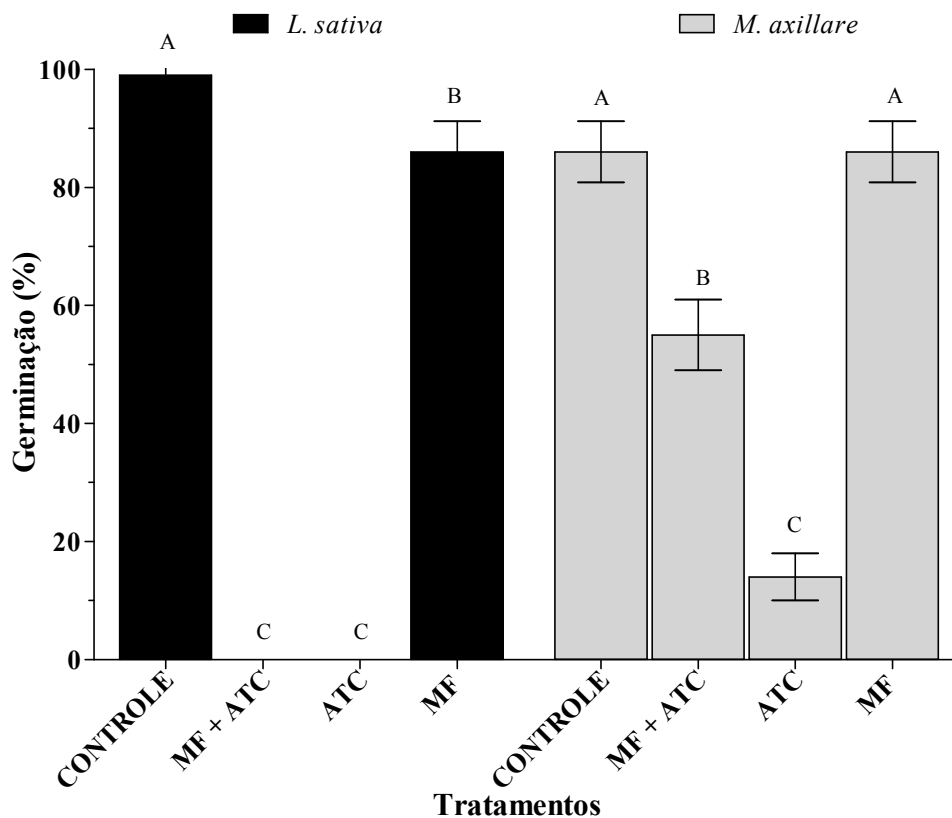


Figura 26. Atividade alelopática das soluções: i) um composto fenólico, o ácido *trans*-cinâmico (ATC); ii) um mix de quatro flavonoides (MF: Rutina, Canferol, Canferol 3'-arabinosídeo e Quercetina) e iii) MF+ATC, sobre *L. sativa* e na leguminosa *M. axillare*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados sobre *L. sativa* revelaram inibição total para a solução ATC. Já para a aplicação do MF, apesar de pouca diferença (13%) teve inibição significativamente distinta relativo ao controle.

Para *M. axillare* houve intensa redução nos valores de germinação sob o tratamento ATC (17,5%). Entretanto, para o tratamento MF não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao seu controle. Uma resposta intrigante e ao mesmo tempo interessante foi a obtida na aplicação da solução contendo os dois tratamentos (MF+ATC), na qual se observou a ocorrência de antagonismo entre as substâncias. Já que para este tratamento os percentuais de germinação foram intermediários e significativamente inferiores ao controle. Sobre esse aspecto, Souza-Filho et al. (2010) cita que, a atividade biológica de uma dada mistura de aleloquímicos não se dá apenas pela concentração de cada componente da mistura, mas também pela interação entre eles. Neste caso especificamente, pelo fato da mistura de flavonoides ter apresentado resposta semelhante ao respectivo controle sua função se deu na forma de um “anti aleloquímico” já que foi utilizada a mesma concentração da solução contendo o ATC exclusivo. Essa tendência na resposta da planta pode ter interpretações e implicações diversas dentro das diferentes áreas da pesquisa. Sabe-se que os flavonoides

atuam, dentre outras, na proteção e preservação celular (SAMANTA et al., 2011). Considerando os resultados observados neste trabalho, presume-se que os flavonoides podem favorecer a germinação ou diminuir os efeitos fitotóxicos do ATC. Entretanto, o seu papel nos mecanismos de defesa antioxidantes contra aleloquímicos requerem mais estudos, uma vez que podem atuar tanto como antioxidantes quanto pró-oxidantes, podendo promover inclusive mais prejuízos que benefícios (BEHLING et al., 2004).

No intuito de identificar quais são os compostos fenólicos que apresentam maior atividade alelopática sobre as espécies receptoras *M. axillare* e *L. sativa* foram realizados ensaios com nove compostos fenólicos com padrão analíticos. Estes resultados são apresentados na figura 27.

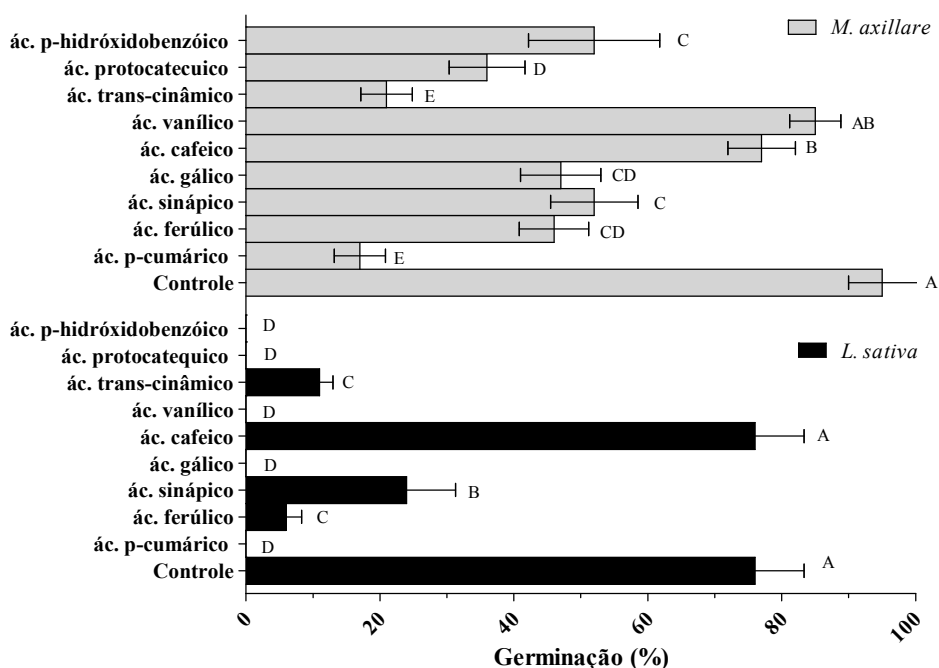


Figura 27. Atividade alelopática de derivados dos ácidos cinâmicos (a forma *trans* do ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido sinápico) e dos ácidos benzoicos (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico) sobre as espécies receptoras *L. sativa* e *M. axillare*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para *L. sativa* a ordem crescente de sensibilidade aos ácidos fenólicos foi: ácido cafeico, ácido sinápico, ácido *trans*-cinâmico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido gálico e ácido *p*-cumárico (Figuras 5, 6 e 27).

Em cada espécie o ácido *p*-cumárico proporcionou as maiores inibições. Mesmo sendo, dentre as espécies avaliadas, a mais resistente aos extratos de *B. humidicola*, a *M. axillare* também foi sensível ao ácido *p*-cumárico. Dessa forma, essa espécie deve ser avaliada em condições de campo em consórcio com a *B. humidicola*, uma vez que Souza-Filho et al. (2005) isolaram da parte aérea dessa gramínea esse derivado do ácido cinâmico.

Embora o isolamento de metabolitos especiais de *B. humidicola* não tenha sido o principal foco do trabalho, estudos concomitantes seguiram neste sentido, e após o fracionamento da fração metanólica da parte aérea como acetato de etila (BHRM-A/26) foi possível isolar uma mistura de saponinas. No entanto, como mencionado na descrição da metodologia, a determinação estrutural está em andamento.

Para efeito de comparação com as repostas de S1 e S2 (ambas as misturas de saponinas) foi testado o flavonoide hesperidina (Figura 7). As espécies submetidas a essas

substâncias foram *L. sativa* e *M. axillare* (Figura 28). Adicionalmente, as respostas das três espécies avaliadas (*L. sativa*, *M. axillare* e *C. mucunoides*), sobre a aplicação do BHRM-A (Figura 25), fração na qual foram isoladas saponinas foi bastante proeminente, o que denota a responsabilidade na inibição da germinação dessas espécies.

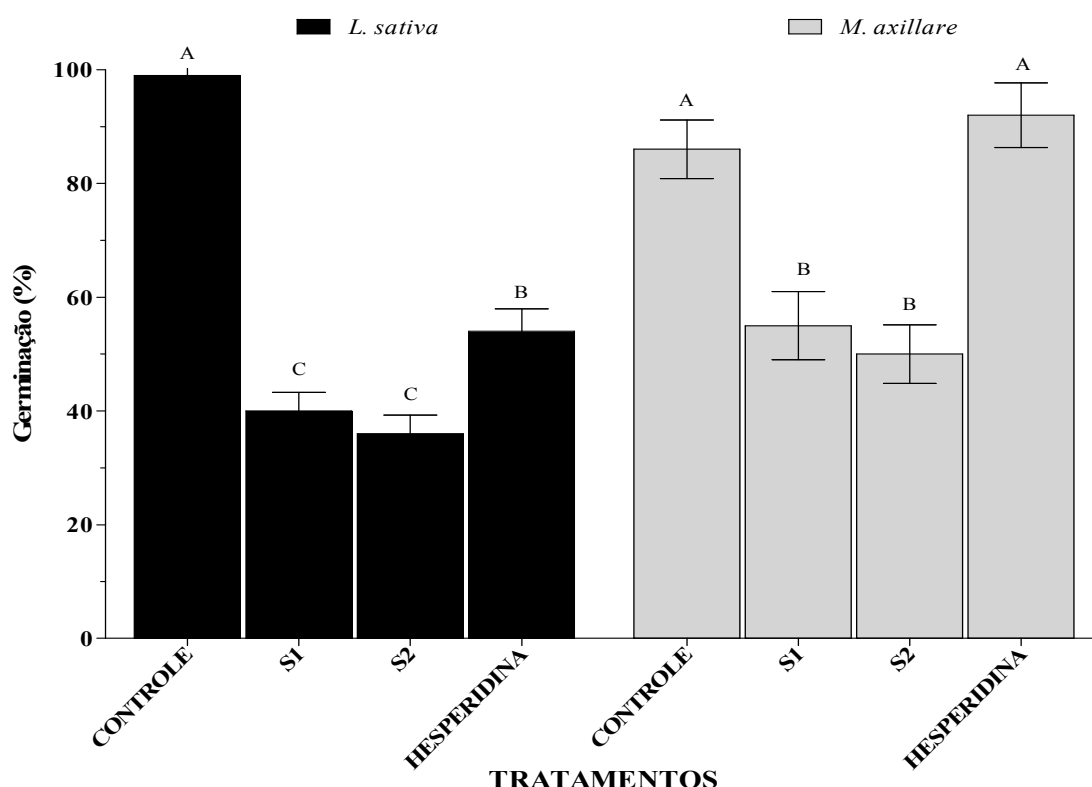


Figura 28. Atividade alelopática de *L. sativa* e *M. axillare* sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de *B. humidicola* e a hesperidina, flavonoide analítico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras avaliadas e o respectivo controle de *L. sativa*. As amostras contendo as saponinas não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), e responderam com as inibições mais elevadas, reforçando a sugestão de apresentarem efeito fitotóxico sobre as duas espécies avaliadas. Apesar de menos intenso que as saponinas, o flavonoide hesperidina influenciou negativamente na germinação das sementes de alface. Já para a leguminosa *M. axillare* apesar da resposta frente às saponinas ter sido muito semelhante àquela observada em *L. sativa* o flavonoide hesperidina resultou em uma resposta similar à observada pela o mix de flavonoides (Figura 26), não diferindo significativamente do seu respectivo controle ($p < 0,05$).

No relativo ao desenvolvimento das plântulas (comprimento do hipocótilo e radícula), foi possível observar que o contato com as amostras de saponinas e do flavonoide promoveram mudanças no desenvolvimento das espécies avaliadas (Figura 29). Essa discussão é de grande valia, uma vez que as variações no desenvolvimento inicial da planta proporcionam prioridade na utilização dos recursos do meio e, por isso, geralmente levam

vantagem na utilização dos mesmos (HAUGLAND & TAWFUQ, 2001; SANDERSON & ELWINGER, 2002; GUSTAFSON et al., 2004).

Em relação ao desenvolvimento da radícula (Figura 29 A), a intensidade na redução do comprimento observada apresentou pouca variação em se tratando das amostras S1 e S2 sobre alface. Muito provavelmente isso se deu em virtude da desuniformidade de resposta das plântulas. Contudo, para *M. axillare* essa diferença pode ser observada entre todas as amostras avaliadas ($p < 0,05$), com destaque para os efeitos na redução da radícula na aplicação das amostras de saponinas oriundas da mistura de subfrações 120-124 (S2).

Comparativamente, para hesperidina, o desenvolvimento radicular de *M. axillare* foi menor do que aquele obtido pelo controle.

Outro fator a se considerar é o desenvolvimento do hipocótilo (Figura 29 B), que no caso de *M. axillare* foi influenciado por todas as amostras, quando comparado ao desenvolvimento do seu controle. Todavia, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas respostas para as duas amostras de saponinas.

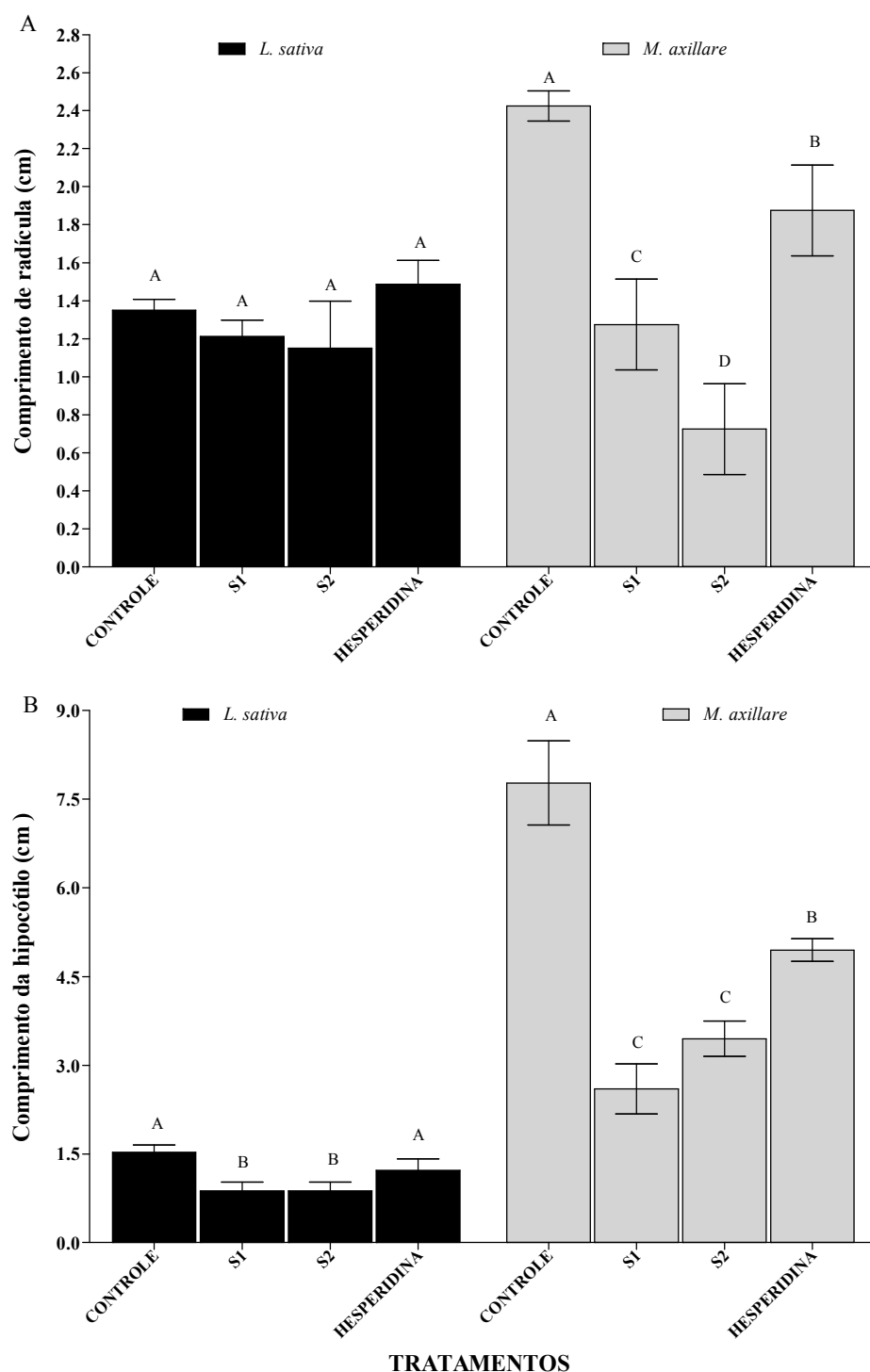


Figura 29. Efeito no desenvolvimento (comprimento de radícula e hipocótilo) de *L. sativa* e *M. axillare* sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de *B. humidicola* e a hesperidina, flavonoide analítico. A) Comprimento de radícula (cm) e B) Comprimento do hipocótilo (cm). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Quando observamos os resultados de peso seco das plântulas normais de cada tratamento observamos que com as saponinas houve um baixo desenvolvimento das plântulas normais, o que resultou em menores valores de massa seca (Figura 30).

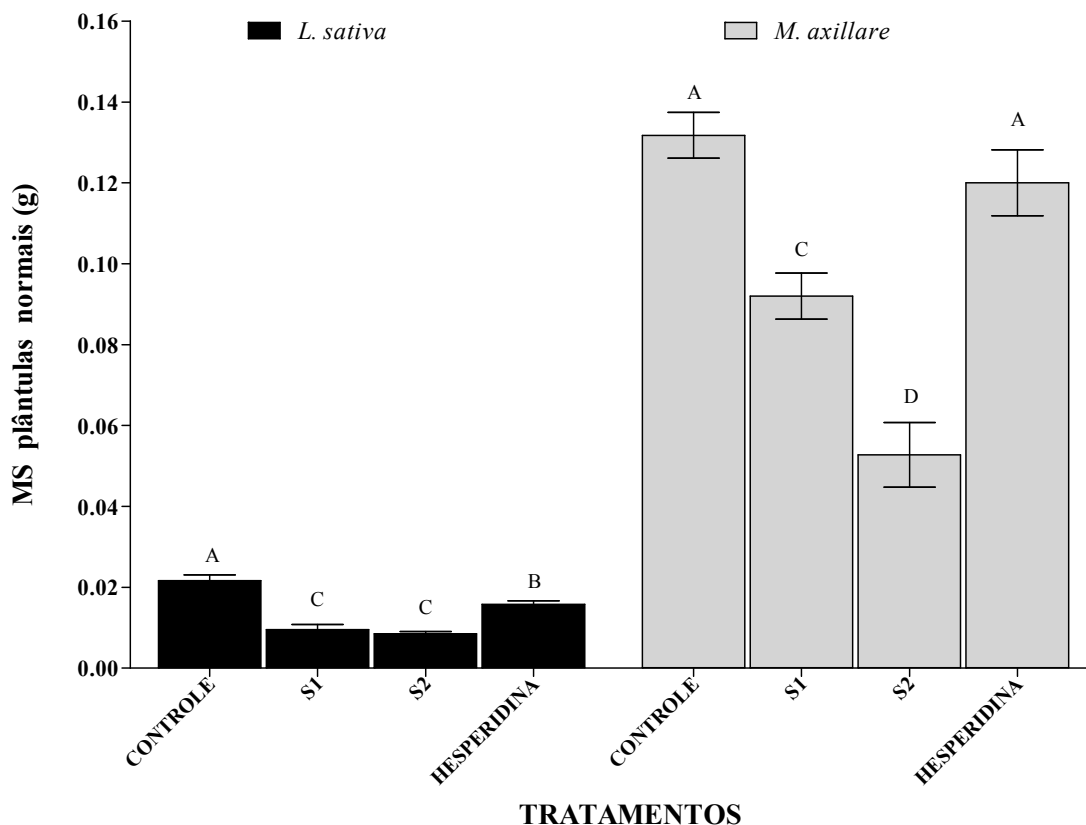


Figura 30. Massa seca (g) de plântulas normais *L. sativa* e *M. axillare* sobre a aplicação das amostras: S1 e S2, dois conjuntos de misturas de saponinas obtidas a partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico de raízes de *B. humidicola* e a hesperidina, flavonoide analítico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para *L. sativa* houve diferença significativa entre todas as amostras em relação ao seu controle. Entre as amostras de saponinas não foi observada diferença nas respostas de massa seca de plântulas de alface. No caso de *M. axillare* o flavonoide não resultou em diferença significativa da para o controle, sugerindo que esta espécie seja relativamente tolerante aos possíveis efeitos negativos destas moléculas. Já em relação à resposta observada pela aplicação das saponinas, houve intensa inibição na conversão de massa seca de *M. axillare* causada pela amostra S2, revelando se tratar de substâncias bastante potente. Um pouco menos intensa foi à resposta resultante da utilização da outra amostra de saponinas (S1) que se diferenciou significativamente da amostra de hesperidina e do tratamento controle. Entre o controle e a amostra de hesperidina não foi observada diferença significativa na massa seca de plântulas normais.

4 CONCLUSÕES

Apesar da prospecção química ser apenas um indicativo das classes de metabólitos presente no material, o auxílio de métodos físicos como a RMN ^1H e ^{13}C , permite confirmar a presença de determinados metabólitos na prospecção. A proposta da presença de determinada classe de metabólito pode auxiliar na interpretação dos resultados obtidos nos bioensaios de germinação. Embora os ácidos cinâmicos e seus derivados não tenham sido identificados com precisão nas técnicas de prospecção e RMN, é provável que os efeitos inibitórios observados estejam associados a eles. Entretanto não descartamos a atuação de outros metabólitos nesta atividade como o caso das saponinas.

De acordo com os resultados da eletroforese capilar as menores concentrações de compostos fenólicos foram detectadas no extrato aquoso de semente, enquanto que a maior concentração foi encontrada no extrato metanólico da parte aérea. Esta técnica foi bastante eficaz na detecção dos compostos fenólicos.

Em relação a espécie padrão *L. sativa* teve sua maior inibição sob os efeitos dos extratos brutos em hexano da raiz e semente, e sob as frações mais apolares. A *B. humidicola* mostrou efeito alelopático sobre as leguminosas avaliadas.

Para os extratos brutos da parte aérea, da raiz e das sementes, as leguminosas mais sensíveis foram *Stylosanthes* spp. e *C. mucunoides*; as espécies mais tolerantes foram *M. axillare* e *D. ovalifolium*.

Os extratos brutos que resultaram em maior efeito fitotóxico são, em ordem crescente de intensidade, Metanol e Metanol/Água para parte aérea, Hexano e Metanol Água para raiz e Hexano e Metanol Água para semente.

Houve uma resposta de germinação semelhante entre o controle e as amostras de flavonoide s. Foi observada uma taxa de germinação de *M. axillare* tipicamente relacionada a antagonismo e sinergismo, em resposta a aplicação de soluções contendo flavonoide s, ácidos cinâmicos em separado e uma mistura dos dois.

Os ácidos fenólicos que geraram maior inibição foram: *p*-cumárico, vanílico, gálico e ferúlico.

As amostras de saponinas obtidas das raízes de *B. humidicola* apresentaram elevada capacidade inibidora.

A resposta positiva dos flavonoide s frente a germinação de *L sativa* e *M. axillare* mostra a tendência que estudos de melhoramento devem priorizar sobre gramíneas que favoreçam a biossíntese desse metabólito, uma vez que este processo consome os derivados cinâmico.

Trabalhos adicionais, principalmente de campo, são necessários para confirmar as conclusões deste estudo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAGHRABI, O.A. Control of wild oat (*Avena fatua*) using some phenolics compounds I - Germination and some growth parameters. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.19, p.17-24, 2011.
- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Allelopathy of plant volatile extracts on seed germination and radicle length of lettuce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. spe, p. 51-67, 2008.
- BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15, n.3, p.285-292, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M.B.; NÓBREGA, F.N.; ROSA, B. FIORAVANTI, M.C.S. Concentrações de saponina esteroidal em diferentes fases do desenvolvimento de *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.279-281, 2009.
- BRUM, K.B.; MITSUE, H.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA F.; FIORAVANTI, M.C.S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p. 39-42, 2007.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; COIMBRA, J.L. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* e do sorgoleone de *Sorghum bicolor* no desenvolvimento de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.30, n.1, p.59-65, 2006.
- CONN, E.E. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. Secondary Products. New York: Academic Press, v.7, 1981. 798p.
- COSTA, F.; PEREYRA ROSSIELLO, R.O.; PACIORNIK, S.; ABREU, J.B. Distribuição vertical de características morfológicas do sistema radicular de *Brachiaria humidicola*. **Pasturas Tropicais**, v.24, n.3, p. 14-20, 2002.
- EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: Putnan, AR. & Tang, C.S. (Eds.) **Allelopathy**. New York, EUA: John Wiley & Sons, 1986. p. 171-188.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasil: 1999. 412p.

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

FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa MG: Ed. UFV, 2010. 537p.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta daninha**, v.29, n.2, p. 311-322, 2011.

GUSTAFSON, D.J.; GIBSON, D.J.; NICKRENT, D.L. Competitive relationships of *Andropogon gerardii* (Big Bluestem) from remnant and restored native populations and select cultivated varieties. **Functional Ecology**. v.18, p.451-457, 2004.

HAUGLAND E.; TAWFIQ M. Root and shoot competition between established grass species and newly sown seedlings during spring growth. **Grass and Forage Science**, v.56, p.193-199, 2001.

INOUE, M.H. et al. Extratos aquosos de *Xylopiya aromatica* e *Annona crassiflora* sobre capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e soja. **Scientia Agraria**, v.10, n.3, p.245-250, 2009.

JACOB, J.; SARADA, S. Role of phenolics in allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v.29, n.2, p. 215-230, 2012.

KHANH, T.D.; CHUNG, M.I.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.191, n.3, p.172-184, 2005.

MAGIERO, J.Q.; ROSSIELLO, R.O.P.; ABREU, J.B.R.; ALVES, B.J.R. Adubação nitrogenada e potássica em pastagem de *Brachiaria humidicola*, estabelecida em Planossolo da Baixada Fluminense, **Pasturas Tropicais**, v.27, n.3, p. 72-76, 2005.

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

MITROVIĆ, M.; JARIĆ, S.; DJURDJEVIĆ, L.; KARADŽIĆ, B.; GAJIĆ, G.; KOSTIĆ, O.; OBERAN, L.J.; PAVLOVIĆ, D.; PAVLOVIĆ, M.; PAVLOVIĆ, P. Allelopathic and Environmental implications of plant phenolic compounds. **Allelopathy Journal**, v.29, n.2, p. 177-198, 2012.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. **Applied linear statistical models**, 2.ed. Homewood, Illinois: Irwin, 1985, 1127 p.

PEREIRA, A.A.G. ***Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickhardt (Poaceae)**: composição fitoquímica dos extratos polares e análise da atividade alelopática. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2003. Orientador: BAYMA, J.C.

PETTIT, G.R.; DOUBEK, D.L.; HERALD, D.L.; NUMATA, A.; TAKAHASI, C.; FUJIKI R.; MIYAMOTO, T. Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the African medicinal plant *Balanites aegyptica*. **J. Nat. Prod.**, v.54, n.6, p.1491-502, 1991.

PIRES, V.S.; TAKETA, A.T.C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Saponins and saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.2, p.135-139, 2002.

PROKSCH, M.; WEISSENBACK, G.; RODRIGUEZ, E. Flavonoids and phenolic acids in adenostoma, a dominant genus of the californian chaparral. **Phytochemistry**, v.24, n.12, p.2889-2891, 1985.

RAO, A.S. Roots flavonoids. **The Botanical Review**, v.56, n.1, p.1-55, 1990.

RAMOS, P. D.; CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, n. Série Agronomia, p. 1-27, 1973.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. Alelopatia e suas interações na formação de pastagens. **Boletim Agropecuário**, 54: 1-55, 2002.

RIBEIRO, R.C. **Estabelecimento de Leguminosas em Pastagens de *Brachiaria humidicola*: Variações Sazonais de Atributos do Dossel Vegetativo**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 53p. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia), 2006. Orientador: ROSSIELLO, R.O.P.

RIBEIRO, R.C.; ROSSIELLO, R.O.P.; MACEDO, R.O.; BARBIERI JUNIOR, É. Introdução de desmódio em pastagem estabelecida de *Brachiaria humidicola*: densidade e frequência e da leguminosa no consórcio. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, v.02, p.41-49, 2007.

ROBERTS, M.J.; LONG, S.P.; TIESZEN, L.L.; BEADLE, C.L. Measurement of plant biomass and net primary production of herbaceous vegetation. In: D.O. Hall, J.M.O. Shurlok, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood, S.P. Long (Eds). **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. Chapman & Hall, London, 1993, p. 1-21.

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S.K. Roles of flavonoids in plants. **Int. J. Pharm. Sci. Tech.**, v.6, n.1, p. 12-35, 2011.

SANDERSON, M.A.; ELWINGER, G.F. Plant density and environment effects Orchardgrass-White clover mixtures. **Crop Science**, v.42, p.2055-2063, 2002.

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

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. **Eclét. Quim.**, v.32, n.4, p. 13, 2007.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. **Eclét. Quim.**, v.33, n.2, p. 18, 2011.

SAS Institute. **Statistical Analysis System SAS/STAT Software Version 9.0**, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002.

SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; ARACHCHI, L.P.V. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v.16, n.2, p. 207-216, 2010.

SINGH, M. et al. HPLC identification of allelopathic compounds from *Lantana camara*. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.1, p.81-89, 1989.

SOARES G.L.G.; VIEIRA T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. grand rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, v.7, p.180-197, 2000.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C.A. Possíveis efeitos alelopáticos de *Brachiaria decumbens* Stapf. sobre o desenvolvimento inicial de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). **Planta Daninha**, v.15, n.2, p. 122-129, 1997.

SOUZA, R.I.C.; RIET-CORREA, F.; BRUM, K.B.; FERNANDES, C.E.; BARBOSA-FERREIRA, M.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.30, n.12, p.1033-1042, 2010a.

SOUZA-FILHO, A. P. S. Potencialidades Alelopáticas envolvendo gramíneas e leguminosas forrageiras e plantas invasoras de pastagens. Tese de doutorado. Jaboticagal: FCAV/UNESP, 1995. 135 p.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta daninha**, v.23, n.1, p.25-32, 2005.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. **Planta daninha**, v.28 n.3, p. 689-697, 2010.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; TREZZI, M.M.; IOUE, M.H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta daninha**, v.29, n.3, p.709-716, 2011.

SUMAN, A; SHAHI, H.N.; SINGH, P.; GAUR, A. Allelopathic influence of *Vigna mungo* (black gram) seeds on germination and radical growth of some crop plants. **Plant Growth Reg.**, v.38, n.1, p.69-74, 2002.

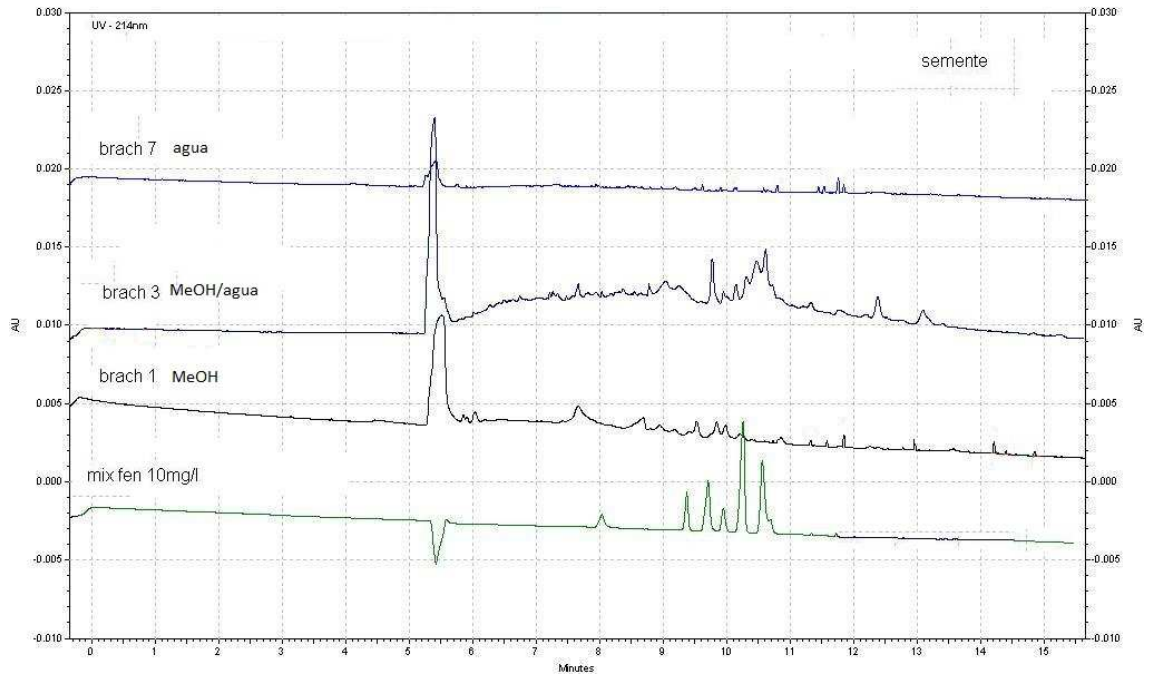
TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER J.; PEIXOTO P.V. 2000. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 310p.

VOKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G.J.; HALLEY, J.M. Effect of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.10, p. 2281-2301, 2003.

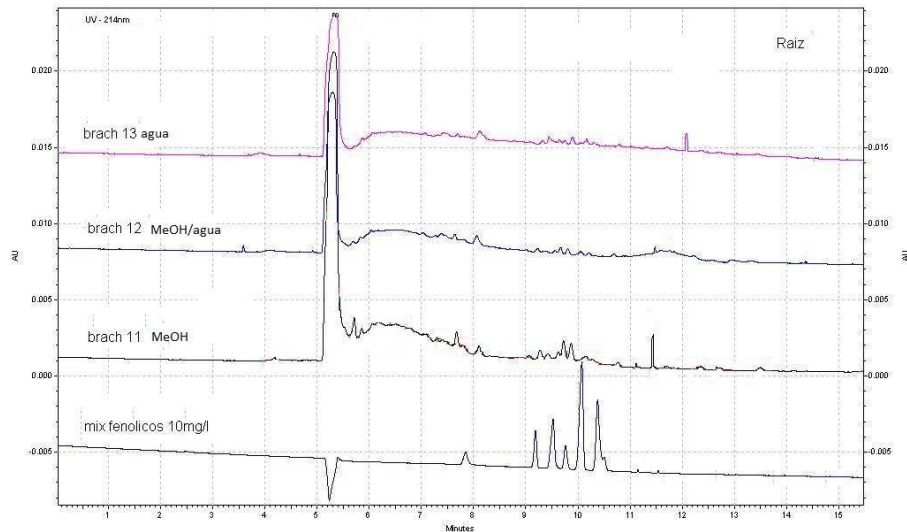
WEIR, T.L.; PARK, S.W.; Vivanco, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.7, n.4, p.472-479, 2004.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8093-8105, 2005.

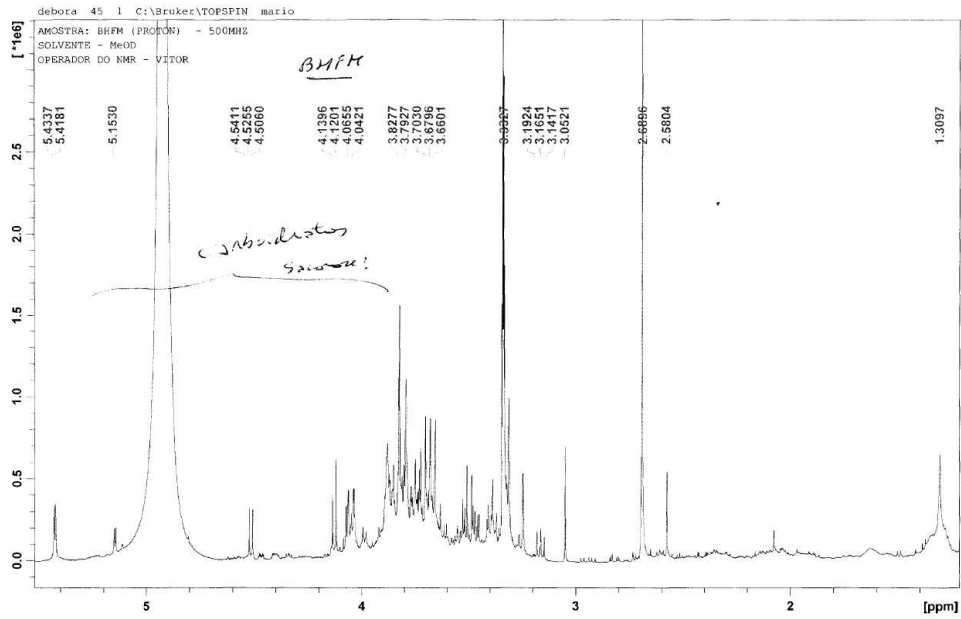
6 ANEXOS



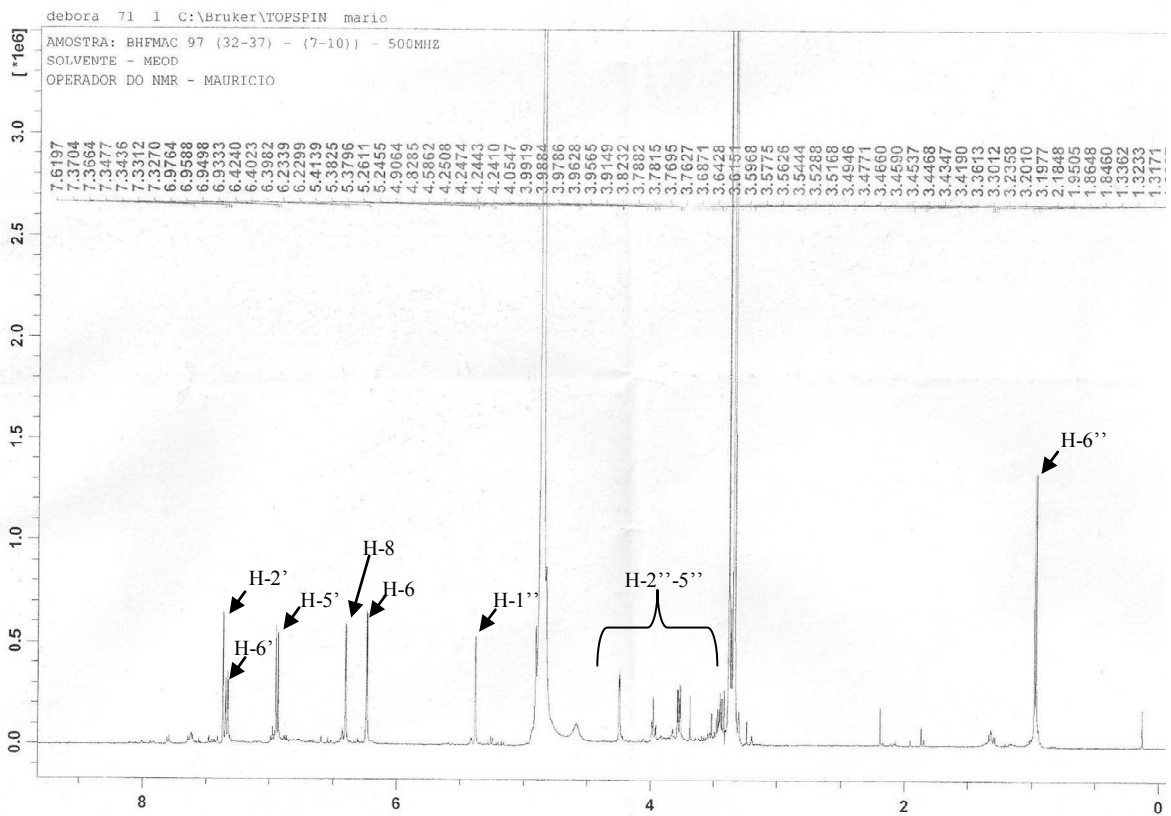
Anexo 1. Eletroferogramas dos extratos brutos de semente de *B. humidicola*. Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de *B. humidicola*; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol Água e A= Água.



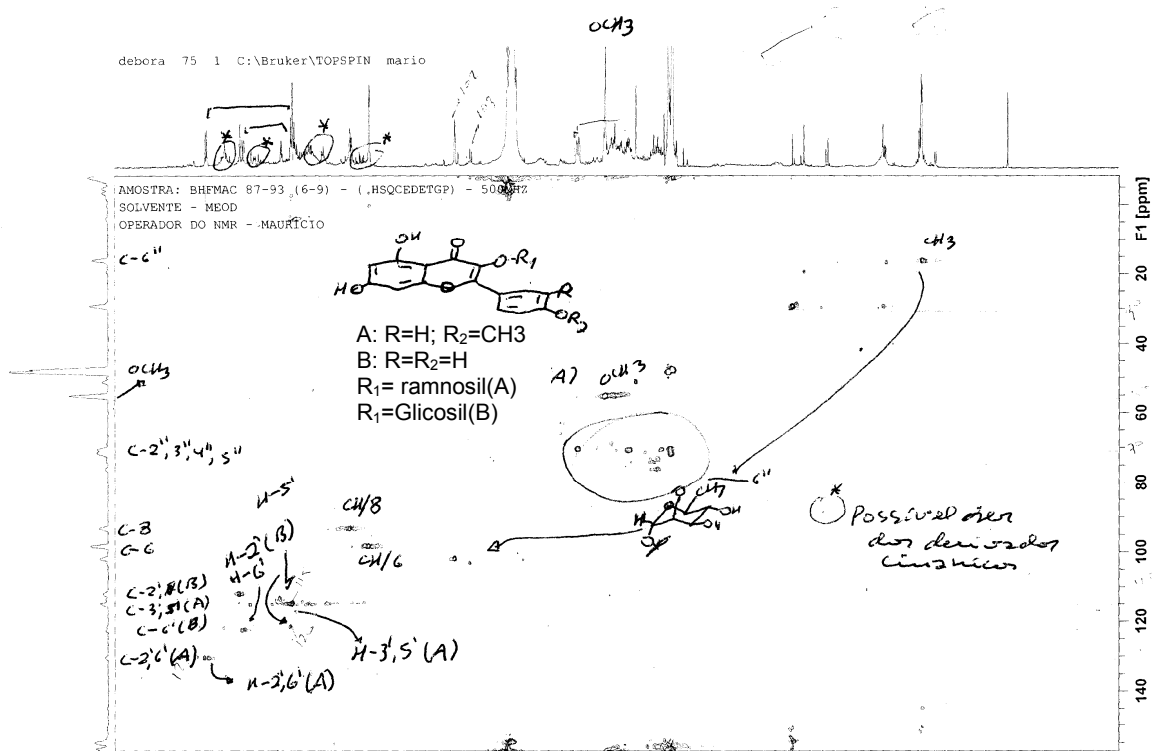
Anexo 2. Eletroferogramas dos extratos brutos de Raiz de *B. humidicola*. Mix Fenólicos= mistura de padrões fenólicos (ác. cafeico, ferúlico, o-benzóico, vanílico e clorogênico); BH= Extrato bruto de *B. humidicola*; H= Hexano; M= Metanol; MA= Metanol Água e A= Água.



Anexo 3. Espectro de extrato metanólico da parte aérea de *Brachiaria humidicola*.



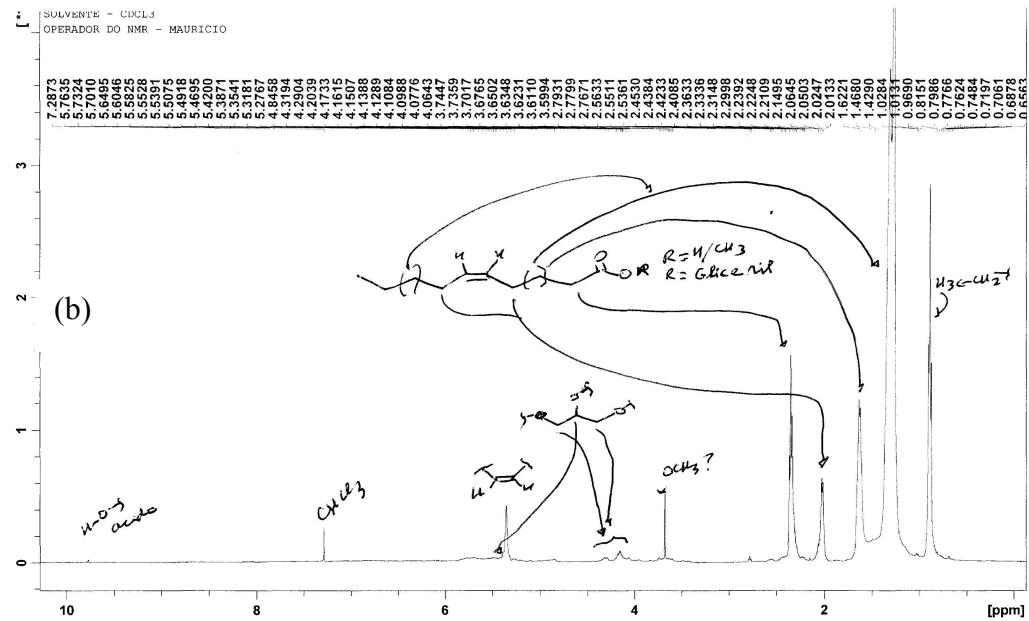
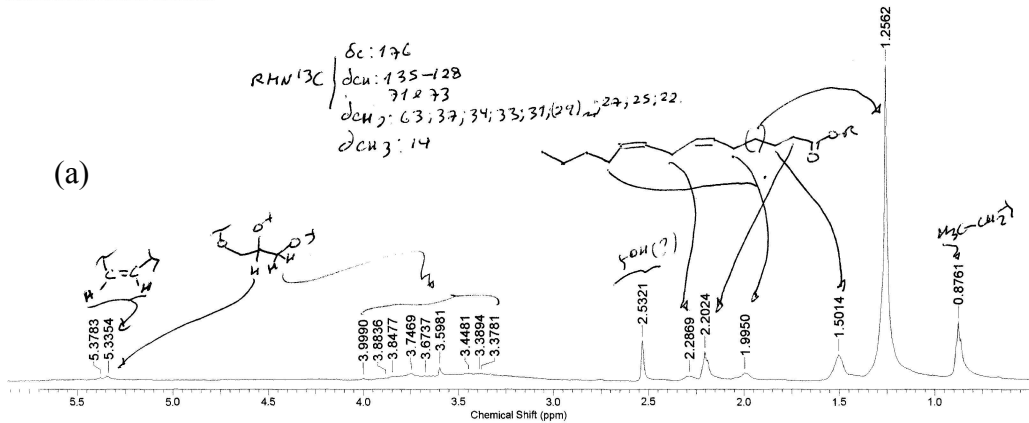
Anexo 4. RMN ^1H do 5,7,3',4'-tetrahydroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona.



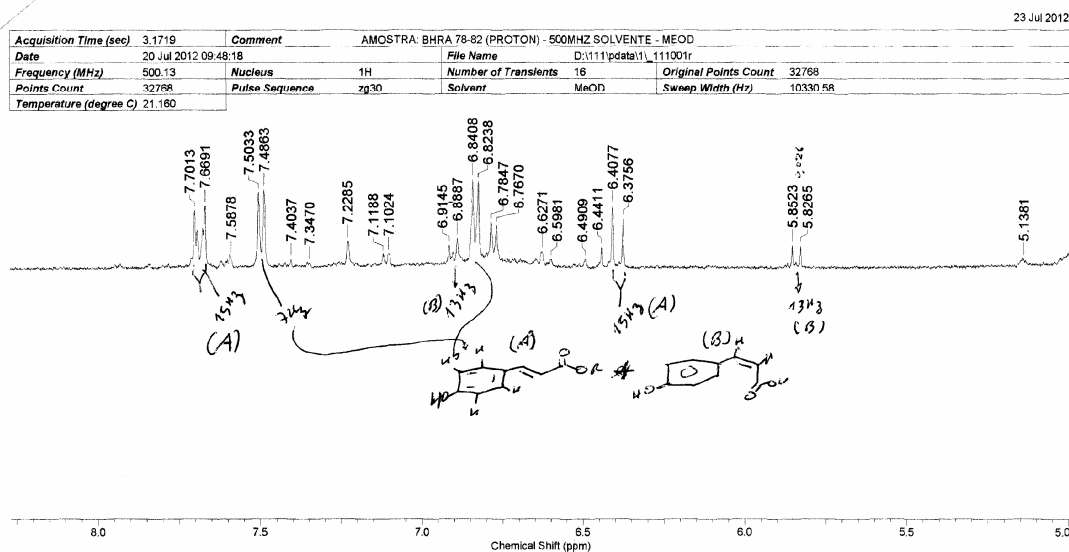
Anexo 5. Espectro da fração acetato de etila do extrato metanólico de folhas de *Brachiaria humidicola*; contendo mistura de ramnosil-flavonoides, e prováveis derivados cinâmicos e outros glicosídeos aromáticos.

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: BISM (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE - DMSO		
Date	07 Mar 2012 15:37:24	File Name	D:\debra_090001r		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	16
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	DMSO-D6
Temperature (degree C)	23.160			Sweep Width (Hz)	10330.58

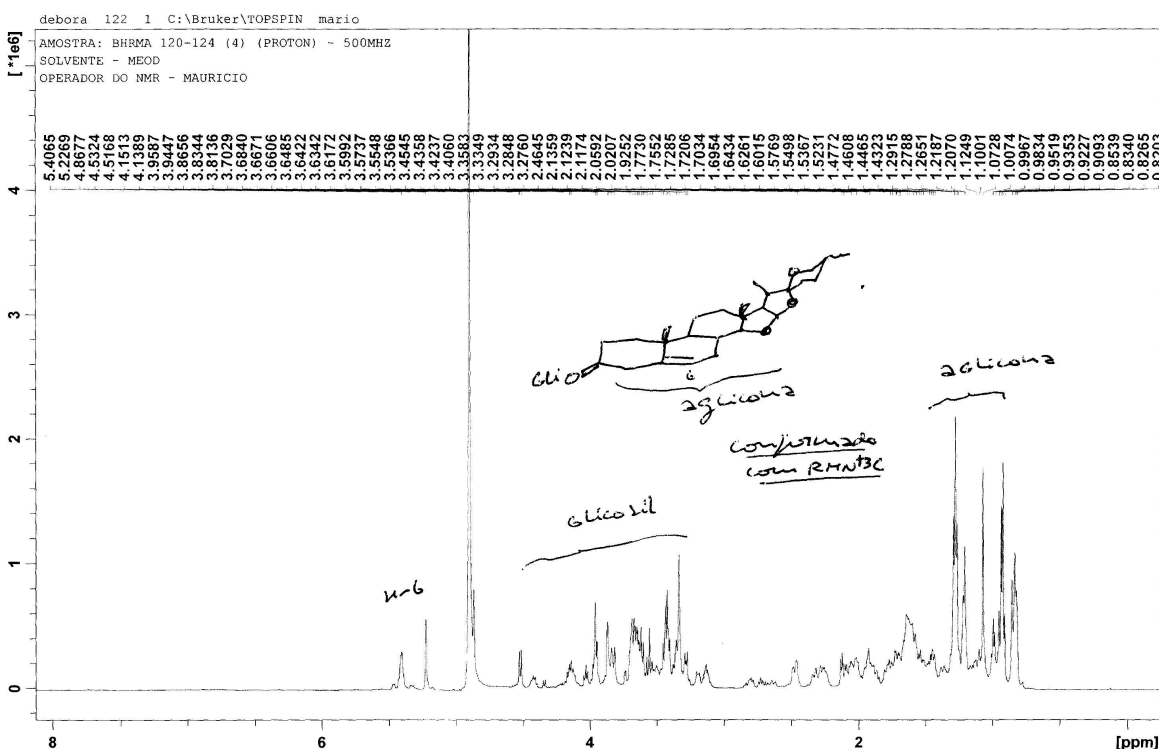
24 May 2012



Anexo 6 a e b. Espectro confirmando a presença de ácidos graxos e triglicerídeos em sementes de *Brachiaria humidicola*.



Anexo 7. Espectro da fração acetato de etila de raízes de *Brachiaria humidicola* confirmando derivados do ácido cinâmico (ac. cumárico) em raízes da planta.



Anexo 8. Espectro da fração acetato de etila da partição do extrato metanólico de etila de raízes de *Brachiaria humidicola* confirmando a presença de saponinas (S1 e S2) na planta.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA ÁGUA DE DECOCCÃO E HIDROLATO DE *Brachiaria humidicola* SOBRE A GERMINAÇÃO DE QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS TROPICAIS

ALLELOPATHIC ACTIVITY OF THE HYDROLATE AND WATER OF DECOCTION OF *Brachiaria humidicola* PLANT PARTS ON THE GERMINATION OF FOUR TROPICAL LEGUMINOUS SPECIES

RESUMO

O conhecimento das interações alelopáticas entre gramíneas e leguminosas podem contribuir para o êxito de pastagens tropicais consorciadas no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito alelopático da água de decocção e hidrolato de partes da planta (raiz, parte aérea e sementes) de *Brachiaria humidicola* (Rendle) sobre quatro leguminosas forrageiras tropicais *Stylosanthes* spp., *Macrotyloma axillare*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium ovalifolium* e em alface (*Lactuca sativa* L.), esta última espécie, utilizada como padrão de sensibilidade em bioensaios alelopáticos. Os resultados obtidos para raízes e parte aérea mostrou, no caso de hidrolato, o maior efeito inibitório sobre a germinação das espécies receptoras, enquanto hidrolato de semente teve um efeito estimulante dependendo das espécie de leguminosa. Em contraste, os extratos de água de decocção apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre a raiz e fração de sementes, e menor na fração da parte aérea. Em relação às espécies receptoras, a leguminosa *M. axillare* apresentou maiores porcentagens de germinação, ou seja, uma maior tolerância aos efeitos inibitórios dos extratos aquosos de *B. humidicola*, enquanto *D. ovalifolium* apresentou a maior sensibilidade.

Palavras-chave: *Calopogonium mucunoides*. *Desmodium ovalifolium*. Hidrodestilação. *Macrotyloma axillare*. Pastagens consorciadas tropicais. *Stylosanthes* spp.

ABSTRACT

Knowledge of allelopathic interactions between grasses and legumes can contribute for the successful establishment of mixed tropical pastures in Brazil. The purpose of this work was to evaluate the allelopathic effect of the hydrolate and water of decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts (root, shoot and seeds) on four tropical forage legumes *Stylosanthes* spp., *Macrotyloma axillare*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium ovalifolium* and on lettuce (*Lactuca sativa* L.), this last species used as a sensitivity standard in allelopathic bioassays. The results obtained for roots and shoots showed, in the case of hydrolate, the highest inhibitory effect on germination rates of the receiving species, while seed hydrolates had a stimulating effect depending on the legume species. In contrast, water of decoction extracts had the highest inhibitory effects on root and seed fraction, and the lowest on the shoot fraction. Regarding the receiving species, germination percentages of *M. axillare* showed higher tolerance to inhibitory effects of the aqueous extracts of *B. humidicola*, while *D. ovalifolium* showed the highest sensitivity.

Keywords: *Calopogonium mucunoides*. *Desmodium Ovalifolium*. Hydrodistillation, *Macrotyloma axillare*. Mixed tropical pastures. *Stylosanthes* spp.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o rebanho bovino brasileiro é considerado o segundo maior do mundo com aproximadamente 209,5 milhões de cabeças (IBGE, 2010). O país é constituído por uma área aproximada de 220 milhões de hectares de pastagens nativas e cultivadas, sendo estas a base da alimentação desse rebanho. Principalmente no Brasil central, as pastagens cultivadas são dominadas pelas gramíneas africanas do gênero *Brachiaria* (MACEDO et al., 2010).

A espécie *B. humidicola* (Rendle) Schweick, tem tido uma grande expansão ao longo dos anos (BRITO et al., 2004). Esta espécie é tolerante a solos de baixa fertilidade e outros estresses ambientais, como secas intensas que ocorrem na região. Além disso, estudos desenvolvidos por Subbarao et al. (2007) sugerem que as raízes desta planta produzem metabolismo secundário produtor de substâncias bastante interessantes para a pesquisa científica. Além disso, estudos desenvolvidos por Subbarao et al. (2007) sugerem que as raízes desta planta liberam no meio ambiente produtos do seu metabolismo secundário que são interessantes para a pesquisa científica.

A introdução de leguminosas forrageiras em monoculturas de gramíneas pode ser uma alternativa bastante interessante para melhorar a fertilidade dos solos tropicais (ALENCAR et al., 2012), e enriquecer a dieta dos animais e conseqüentemente, aumentar a produtividade das pastagens (MACEDO et al., 2010). No entanto, o uso de leguminosas, sob a forma de pastagens consorciadas no Brasil ainda continua insignificante (BARCELLOS et al., 2008). Embora o uso de pastagens consorciadas de gramíneas e leguminosas possua muitos atrativos econômicos e ambientais, o baixo uso dessa tecnologia é principalmente devido dificuldades no estabelecimento e a baixa persistência na pastagem das leguminosas ao longo do tempo (BARCELLOS et al., 2008).

Além das tradicionais diferenças morfo-fisiológicas observadas entre gramíneas e leguminosas (RAO, et al., 1995), existem ainda outros fatores que também podem afetar o estabelecimento e persistência das leguminosas, como o fenômeno conhecido como alelopatia (RICE, 1984; SMITH, 1989). Os aleloquímicos são produzidos pelas plantas e liberados no meio ambiente, principalmente através de processos como a exsudação, lixiviação e volatilização (KHANH, et al., 2005; XUAN, et al., 2005; WESTON et al., 2012).

A demanda de estudos acerca dos metabólitos especiais das plantas vem aumentando nos últimos anos, principalmente em função das pesquisas com herbicidas naturais ou na sua utilização como protótipos de herbicidas sintéticos. Além desse foco de estudo, o conhecimento das potencialidades alelopáticas é essencial para permitir o sucesso dos sistemas de consorciação de gramíneas e leguminosas.

Nesse contexto, apesar de existir pesquisas confirmando que a forrageira *B. humidicola* possui atividade alelopática (SOUZA-FILHO et al., 2006), não existem relatos de estudos envolvendo avaliação da atividade alelopática de frações com substâncias mais voláteis desta planta, como o hidrolato e a água de decocção de *B. humidicola* sobre leguminosas forrageiras normalmente utilizadas em consórcios de pastagens no Brasil.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito alelopático do hidrolato e da água de decocção obtida da parte aérea, raízes e sementes de *B. humidicola* sobre a germinação de sementes de leguminosas forrageiras tropicais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em Laboratórios do Instituto de Ciências Exatas e de Agronomia localizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica, RJ (Latitude: 22°46'59" S, Longitude: 43°40'45" W e altitude de 33 m).

A *B. humidicola* (planta doadora) foi coletada em uma pastagem estabelecida a mais de 25 anos sobre um Planossolo Háptico, submetido a pastejos eventuais por caprinos e bovinos (MAGIERO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007).

O solo da área experimental foi descrito por Ramos et al. (1973), sendo classificado como Hidromórfico Cinzento Distrófico, a moderado, textura média, Série Ecologia, que no atual Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 1999), corresponde ao Planossolo Háptico. Tratam-se de solos que apresentam absoluto predomínio de areias nos primeiros 0,5-0,7 m do perfil (Areia grossa = 60-65%; Areia fina: 30-25%; e Argila total < 4%). A partir dessa profundidade ocorre um horizonte B_{tx} de textura barro-argilo-arenosa, e estrutura maciça e dura quando seca, e friável quando úmida (fragipã). Dadas tais propriedades físicas, a capacidade de retenção de água nos horizontes superficiais é muito baixa e a altura do lençol freático oscila sazonalmente (RAMOS et al., 1973).

O clima da região é caracterizado como quente e úmido no verão, sem invernos pronunciados, e muito secos. Este tipo climático, embora não corresponda exatamente ao clima de savanas, enquadra-se no tipo Aw da classificação de Köppen.

A amostragem foi feita na parte da manhã (07:00 h) e o material vegetal foi transportado para o laboratório em caixa isotérmica. As sementes foram coletadas em janeiro de 2010, durante o período de floração da gramínea, e postas para secar à sombra em temperatura ambiente.

Raiz e parte aérea foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 cm para o posterior processamento analítico. Após isso, 0,5 kg de cada fração foram colocados num balão de fundo redondo de 5 litros com dois terços de água destilada e deionizada. O balão foi acoplado a um sistema do tipo Clevenger para realizar a destilação a vapor. O mesmo procedimento foi seguido para as sementes, exceto por sua trituração prévia num liquidificador. O material vegetal permaneceu em contato com a água em ebulição durante um período de 4 h, a fim de extrair o óleo essencial de *B. humidicola*. No entanto, nenhum óleo foi obtido, provavelmente devido à sua baixa concentração. O produto de evaporação e da subsequente condensação foi considerado como sendo o hidrolato das respectivas frações. Enquanto a água que permaneceu no balão constituiu a água de decocção. Para se obter quantidades suficientes de ambas as frações, foi necessário executar quatro ciclos sucessivos de hidrodestilação.

A susceptibilidade alelopáticas das espécies receptoras foi avaliada através de testes de germinação (SOUZA-FILHO et al., 2006; SENARATHNE et al., 2010; MUBARAK et al., 2011). Sementes de *Stylosanthes* spp., *Calopogonium mucunoides*, *Macrotyloma axillare* cv. Java e *Desmodium ovalifolium* cv. Itabela foram obtidos do banco de sementes da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. A espécie alface (*Lactuca sativa* L.) veio de fonte comercial. Esta espécie foi escolhida porque é considerada um padrão de sensibilidade em bioensaios de atividade alelopática (ALVES et al., 2004; SOUZA-FILHO et al., 2010). Quando necessário, a quebra de dormência das sementes das espécies das leguminosas, foi realizada seguindo as especificações das Regras para Análise de Sementes Brasil (2009), conforme indicado na Tabela 1.

Alíquotas de 5 ml de cada hidrodestilado (hidrolato) e da água de decocção residual foram aplicados sobre a superfície de três folhas de papel Germitest[®] autoclavado (120°C) em recipientes do tipo gerbox, e, em seguida, 25 sementes de cada espécie foram colocadas sobre

o papel umedecido. No tratamento controle, o papel Germitest® foi umedecido com água deionizada. Os recipientes gerbox foram incubadas em câmaras do tipo BOD sob condições variáveis de luz e temperatura, específico a cada espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos de quebra de dormência, temperatura de incubação e duração do fotoperíodo para os bioensaios de alelopátia em alface (*L. sativa*) e quatro leguminosas forrageiras tropicais.

Espécies	Métodos de quebra de dormência ⁽¹⁾	Temperatura ⁽²⁾ (°C)	Duração do fotoperíodo ⁽³⁾ (h)
<i>Lactuca sativa</i>	-	20	16
<i>Macrotyloma axillare</i>	Remoção do tegumento	25	8
<i>Calopogonio mucunoides</i>	-	25	0
<i>Stylosanthes spp.</i>	Água a 80°C	35	0
<i>Desmodium ovalifolium</i>	Escarificação	25	8

^{(1), (2), (3)} De acordo com Brasil (2009).

Os cálculos das taxas de germinação das sementes foram realizados segundo especificações brasileiras. Assim, a germinação de sementes correspondeu à proporção de sementes que produziram plântulas classificadas como normais, ou seja, aquelas que tiveram a raiz primária e a parte aérea bem desenvolvida Brasil (2009). Os dados de germinação foram expressos em porcentagem (%) e transformado em $\sqrt{\%} / 100$ para assegurar a normalidade dos resíduos (NETER et al., 1985). Os dados foram analisados pelos procedimentos estatísticos do software SAS–Statistical Analysis System (SAS, 2002). O PROC GLM foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Atividade Alelopática da Parte Aérea

Os resultados dos bioensaios mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as espécies receptoras, tanto para o hidrolato como para água de decocção de parte aérea de *B. humidicola*, quando comparado com seus respectivos controles (Figura 1A e B). A parte aérea do hidrolato inibiu completamente a germinação de alface (ALVES et al., 2004), e também teve efeito supressor sobre a leguminosa *D. ovalifolium*. Do mesmo modo, *Stylosanthes* spp. foi severamente afetado com uma redução absoluta de 66%, ou 54% considerando a sua porcentagem de germinação em água deionizada (controle). Em contraste, a aplicação do hidrolato não teve nenhum efeito sobre as taxas de germinação absolutas ou relativas de *C. mucunoides*, enquanto para *M. axillare* a redução foi relativamente pequena (16%), porém estatisticamente significativa (Figura 1A). Em relação a água de decocção da parte aérea, os seus efeitos inibitórios foram menores em comparação aos extratos de hidrolato, evidenciado pelo fato de que não houve total inibição de germinação em nenhuma das espécies estudadas (Figura 1B). De fato, não houve diferença significativa entre *M. axillare* e *C. mucunoides* quando comparados a seus controles. Por outro lado, as taxas de germinação de *Stylosanthes* e *Desmodium* em resposta à aplicação de água de decocção foram menores do que para a alface, espécie que foi razoavelmente imune, apesar de ser considerado um padrão de sensibilidade.

Coletivamente, estes resultados sugerem que os agentes aleloquímicos estão presentes em concentrações mais elevadas no hidrolato.

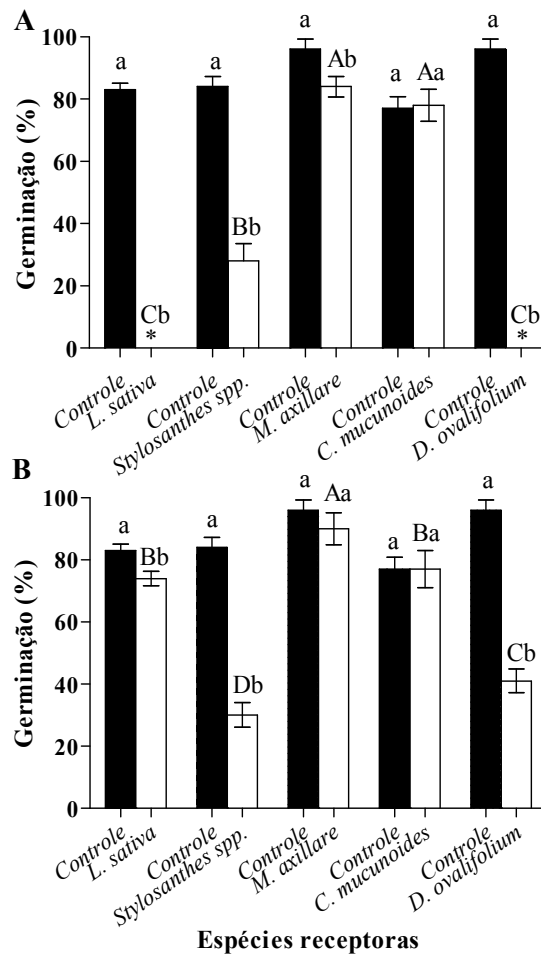


Figura 1. Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da parte aérea de *B. humidicola*, o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) das médias entre as espécies receptoras. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.

3.2 Atividade Alelopática de Raiz

Considerando os efeitos alelopáticos atribuíveis aos constituintes do hidrolato ou água de decocção, os extratos de raiz tiveram uma maior capacidade inibitória do que extratos da parte aérea (Figuras 1 e 2). Inibição completa (alface e *Desmodium*) ou redução acentuada (*Stylosanthes*) das porcentagens de germinação foram observadas quando as sementes foram tratadas com hidrolatos de raiz (Figura 2A). Mesmo as espécies mais tolerantes *M. axillare* e *C. mucunoides* apresentaram uma redução significativa nas taxas de germinação em relação aos tratamentos controle (Figura 2A). Além disso, em oposição ao comportamento da parte aérea, a água de decocção das raízes mostrou uma elevada atividade biológica (Figuras 1B e 2B). De fato, a inibição total de *D. ovalifolium* e *C. mucunoides* foi observada, sendo este último um resultado inesperado. Além disso, as porcentagens de germinação de sementes de *Stylosanthes* spp. e *L. sativa* não diferiram significativamente (Figura 2 B).

A melhor resposta em termos de resistência foi expressa por *M. axillare*, com 96% de

germinação para o tratamento controle em comparação a 49% para água de decocção, um desempenho significativamente maior ($p \leq 0,05$) do que as demais espécies estudadas. Assim, os dados sugerem que, para as raízes de *Brachiaria humidicola*, a atividade alelopática está associada a moléculas não-voláteis que, provavelmente, estão concentradas na fração água de decocção.

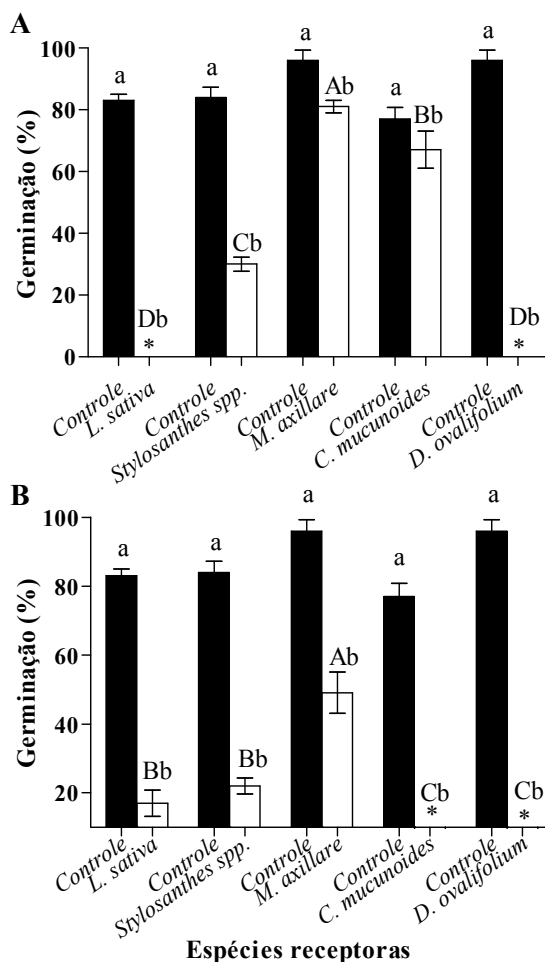


Figura 2. Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da raiz de *B. humidicola*, o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) das médias entre as espécies de receptores. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.

3.3 Atividade Alelopática de Semente

A figura 3 (A e B) mostra a porcentagem de germinação de sementes das espécies receptoras, quando tratadas com extratos obtidos a partir de hidrolatos ou água de decocção de sementes de *B. humidicola*. Em relação ao hidrolato, os efeitos inibitórios dos agentes aleloquímicos foram brandos, para *M. axillare*, ou totalmente ausente, como no caso de *Stylosanthes spp.*, ou mesmo expresso como um efeito estimulatório significativo ($p \leq 0,05$) em *C. mucunoides*. Mais uma vez, os dados confirmaram a maior sensibilidade de *D. ovalifolium* em relação às outras espécies, sua resposta inibitória igualou-se ao da alfaca (Figura 3A). Em contraste ao potencial inibitório limitado de hidrolato de semente, a água de decocção

mostrou uma atividade alelopática elevada, envolvendo a inibição completa da germinação de sementes de *C. mucunoides* e *L. sativa*, uma resposta muito semelhante a observada para os extratos de água de decocção de raiz (Figuras 2B e 3B). Igualmente, as respostas de *Stylosanthes* spp. e *M. axillare* a aplicação da água de decocção das sementes teve efeito paralelo ao da raiz (Figuras 2B e 3B).

Tomados em conjunto, estes resultados indicam que hidrolatos de raiz e parte aérea, tiveram o maior efeito inibitório sobre a germinação das espécies forrageiras leguminosas estudadas. Hidrolatos de sementes tiveram um efeito inibitório brando, incluindo ação estimulante sobre a taxa de germinação de sementes de *C. mucunoides*. Em contraste, os extratos de água de decocção apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre as frações de raiz e semente e, os menores na fração da parte aérea. Em relação às espécies receptoras, a alta porcentagem de germinação de *M. axillare* mostrou maior tolerância aos efeitos inibitórios dos extratos aquosos de *B. humidicola*, enquanto o *D. ovalifolium* apresentou a maior sensibilidade.

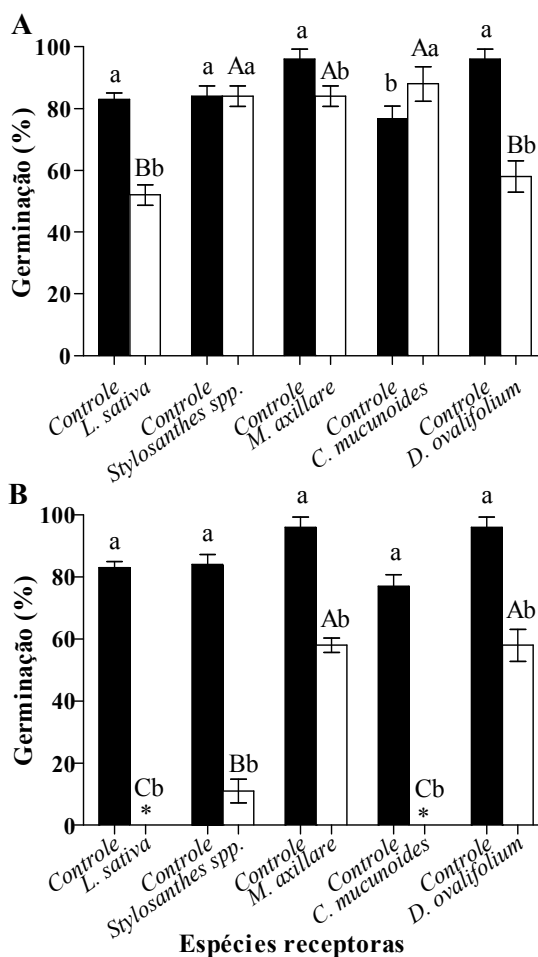


Figura 3. Porcentagem de germinação de cinco espécies receptoras em resposta à aplicação dos extratos preparados a partir da semente de *B. humidicola*, o hidrolato (A) ou água de decocção (B), em relação aos seus respectivos controles (apenas água deionizada). Letras maiúsculas na parte superior das barras indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) das médias entre as espécies de receptores. Letras minúsculas mostram a diferença de cada espécie e seu controle.

4 CONCLUSÕES

O hidrolato e a água de decocção de partes de *B. humidicola* (raiz, parte aérea e semente) mostraram efeito inibitório sobre as espécies receptoras, *L. sativa*, *Stylosanthes* spp, *C. mucunoides* e *D. ovalifolium*.

Macrotyloma axillare apresentou as maiores taxas de germinação sob a aplicação dos extratos de *B. humidicola*, enquanto o *D. ovalifolium* apresentou a maior sensibilidade.

Água de decocção, principalmente, obtido a partir da raiz, resultou em maior efeito inibitório. Em contraste, o hidrolato de semente mostrou menor atividade alelopática.

Em relação às partes de *B. humidicola*, os extratos da parte aérea mostraram um resultado mais brando na inibição da germinação das espécies receptoras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, K.M.C.; RODRIGUES, A.P.D.C.; PEREIRA, S.R.; LAURA, V.A. Priming of *Stylosanthes* seeds. **Ciência Rural**, v.42, n.4, pp. 627-632, 2012.
- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Allelopathy of plant volatile extracts on seed germination and radicle length of lettuce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.spe, pp. 51-67, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C., Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, pp. 519-528, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-(IBGE). **Produção Pecuária Municipal**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2010. v.38, 65 p.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma Área Emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.
- KHANH, T.D.; CHUNG, I.M.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.191, n.3, pp.172-184, 2005.
- MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; REZENDE, C.P.; PEREIRA, J.M.; CADISCH, G.; ROUWS, J.R.C.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Forage intake and botanical composition of feed for cattle fed *Brachiaria*/legume mixtures. **Scientia Agricola**, v.67, n.4, pp.384-392, 2010.
- MAGIERO, J.Q.; ROSSIELLO, R.O.P.; ABREU, J.B.R.; ALVES, B.J.R. Adubação nitrogenada e potássica em pastagem de *Brachiaria humidicola*, estabelecida em Planossolo da Baixada Fluminense. **Pasturas Tropicales**, v.27, n.3, pp.72-76, 2005.
- MUBARAK, S.S.; IBRAR, M.; EHSAN, M.; ALI, N. Allelopathic potential of *Papaver pavinum* against two cultivars of wheat Fisch and C.A. Mey **Journal of Biological & Environmental Sciences**, v.1, n.5, pp.39-48, 2011.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. **Applied linear statistical models**. 2.ed. Homewood, Illinois: Irwin, 1985, 1127 p.

RAO, I.M.; AYARZA, M.A.; GARCIA, R. Adaptive attributes of tropical forage species to acid soils I. Differences in plant growth, nutrient acquisition and nutrient utilization among C₄ grasses and C₃ legumes. **Journal of Plant Nutrition**. v.18, n.10, pp.2135-2155, 1995.

RIBEIRO, R.C.; ROSSIELLO, R.O.P.; MACEDO, R.O.; BARBIERI JUNIOR. É. Introdução de desmódio em pastagem estabelecida de *Brachiaria humidicola*: densidade e frequência e da leguminosa no consórcio. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v.02, pp.41-49, 2007.

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

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. K. Roles of flavonoids in plants. **Int J Pharm Sci Tech**, v. 6, n.1, p. 12-35, 2011.

SAS Institute. **Statistical Analysis System SAS/STAT Software Version 9.0**, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002.

SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; ARACHCHI, L.P.V. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v.16, n.2, pp.207-216, 2010.

SMITH, A.E. The potential allelopathic of bitter sneezeweed (*Helenium amarum*). **Weed Science**, v.37, pp.665-669, 1989.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório - revisão crítica. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.3, pp. 689-697, 2010.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.1, pp. 25-32, 2006.

SUBBARAO, G.V.; WANG, H.Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W.L. NH₄⁺ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. **Plant and Soil**, v. 290, n. 1-2 , p. 245-257, 2007.

WESTON, L.A.; RYAN, P.R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.9, pp. 3445-3454, 2012.

XUAN, T.D.; TAWATA, S.; KHANH, T.D.; CHUNG, I.M. Decomposition of allopathic plants in soil. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.191, n.3, pp.162-171, 2005.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA PALHA DE *Brachiaria humidicola* NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, ESTRUTURAIS E PRODUTIVAS DE *Cajanus cajan* E *Stylosanthes* spp.

INFLUENCE OF *Brachiaria humidicola* STRAW ON PHYSIOLOGICAL, STRUCTURAL AND PRODUCTIVE RESPONSES OF *Cajanus cajan* AND *Stylosanthes* spp.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da adição de níveis crescentes de palha de *Brachiaria humidicola* sobre características fisiológicas, estruturais e produtivas das leguminosas *Cajanus cajan* e *Stylosanthes* spp. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação instalada na área experimental de Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso – IFMT *Campus* Confresa. A área está localizada na região nordeste do estado de Mato Grosso (10°38'38''S, 43°42'26''W), com altitude de 240 m e precipitação média anual de 1.800 mm/ano. O solo de cultivo é predominante na região e se caracteriza como um Argissolo Vermelho Amarelo textura franco arenosa. Foram avaliados os efeitos de quatro níveis (0, 5, 10, 20% p/p) de adição da palha de *B. humidicola* ao solo. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada unidade experimental um vaso com capacidade de 8 L. Cada vaso recebeu quatro plântulas de leguminosa pré-germinadas (3-5 cm). Foram realizadas leituras com um clorofilômetro portátil, altura de plantas, registro do número de folhas por planta e de mortalidade de plantas e ao final do ciclo, foi quantificada a produção de massa fresca e seca das leguminosas em cada tratamento. Os resultados evidenciaram que as leituras de clorofila são parâmetros bastante sensíveis ao efeito inibitório ocasionado pela presença da palha de *B. humidicola*. Em particular, a relação clorofila *a/b*, pode ser utilizada como importante índice do efeito alelopático exercido pelo capim *B. humidicola* sobre a leguminosa *C. cajan*. Ambas leguminosas, *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. tiveram suas características estruturais e produtivas fortemente influenciadas pela inclusão da palha de *B. humidicola* no substrato de cultivo.

Palavras-chave: Adubação verde. Alelopatia. Clorofila. Consórcio de pastagem. Feijão Guandu.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the influence levels increasing of *Brachiaria humidicola* straw on productive, structural and physiological characteristics of *Cajanus cajan* and *Stylosanthes* spp. legumes. Experiment was carried in a greenhouse installed in the experimental area of Animal Science, Federal Institute of Education, Science and Technology of Mato Grosso-IFMT Confresa *Campus*. The area is located in the northeastern state Mato Grosso (10° 38'38"S 43° 42'26"W), with an altitude of 240 m and average annual rainfall of 1.800 mm/year. Soil cultivation was the predominant in the region that is characterized as a red yellow podzolic sandy loam texture. The effects of four levels (0, 5, 10, 20% w/w) including *B. humidicola* straw mixed with soil. The design was completely randomized with four replications, each experimental unit was a container with a capacity of eight liter to receive four legume seedlings already pre-detached (3-5 cm). Readings were taken with equipment portable chlorophyll, plant height, counting the number of leaves per plant, plant mortality record and the end of the cycle was quantified the production of fresh and dry legumes in each treatment. The results showed that the readings chlorophyll content is parameters very sensitive to the inhibitory effect caused by the inclusion of *B. humidicola*. In particular, the chlorophyll a / b can be used as an important index of allelopathic effect exerted by the grass *B. humidicola* on legume *C. cajan*. Both legumes *C. cajan* and *Stylosanthes* spp. had their structural characteristics and productive strongly influenced by the inclusion of straw *B. humidicola* the culture substrate.

Key words: Allelopathy. Chlorophyll. Mixed pasture. Green manuring. Pigeonpea.

1 INTRODUÇÃO

O consórcio entre as famílias *Poaceae* e *Fabaceae* envolve espécies com características morfofisiológicas e com taxas de crescimento diferenciadas. Como é usual no caso onde duas ou mais espécies são cultivadas num mesmo agroecossistema, relações de competição, se estabelecem entre os componentes, em um prazo mais ou menos curto, e a persistência de cada espécie dependerá da sua habilidade competitiva (MATTOS & PEDREIRA, 1984; MESQUITA et al., 2002; BARCELLOS et al., 2008).

A espécie *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick é uma das principais forrageiras perenes tropicais utilizadas na formação de pastagens para bovinos no Brasil (BRITO et al., 2004). Apesar da sua elevada adaptação a solos de baixa fertilidade, mal drenados ou encharcados, esta espécie possui algumas limitações nutricionais relativas a baixa digestibilidade e baixos teores de N proteico (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010).

Uma das formas de melhorar a fertilidade dos solos tropicais, melhorar a produtividade da pastagem e enriquecer a dieta dos animais é através da consorciação entre gramíneas e leguminosas forrageiras. Todavia, esses benefícios, que apontam na direção do aumento da rentabilidade e sustentabilidade das pastagens consorciadas, poucas vezes são efetivamente realizados, uma vez que a utilização de leguminosas nas pastagens brasileiras continua baixa (BARCELLOS et al., 2008). Várias razões podem justificar esse fato, incluindo as tentativas fracassadas no passado, mas atualmente, a visão predominante é que a não adoção dessa tecnologia é devida, principalmente, à baixa persistência das leguminosas tropicais nas pastagens (PEREIRA, 2002; BARCELLOS et al., 2008). Durante muito tempo, a instabilidade verificada nos ecossistemas de pastagens consorciadas de gramíneas e leguminosas foi atribuída às diferenças fisiológicas observadas entre as espécies e aos fatores de competição como água, luz e nutrientes (MESQUITA et al., 2002). Entretanto, se sabe que uma planta pode interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento de outra planta na sua imediação, processo chamado de alelopatia (RICE, 1984). Isso ocorre através da produção e liberação de compostos químicos (aleloquímicos) pela espécie chamada doadora. A liberação desses compostos para o meio ambiente pode ser feita através de exsudação do sistema radicular, volatilização ou lavagem pelas águas das chuvas ou orvalho. Outra forma de ocorrência é através da decomposição de resíduos vegetais nos solos, na qual leva a formação de substâncias orgânicas, que podem interferir em processos metabólicos das plantas vizinhas ou receptoras (RICE 1984; ZHANG et al., 2010).

Sob o ponto de vista de manejo de pastagens consorciadas, o conhecimento sobre os fatores relacionados à alelopatia das forrageiras envolvidas no consórcio serve para selecionar espécies que possam compor pastagens equilibradas, com reflexos extremamente favoráveis na sua produtividade e longevidade (WARDLE, 1987; BARCELLOS et al., 2008). Dessa forma, são indispensáveis pesquisas que apontem as espécies mais adequadas para o sucesso de pastagens consorciadas. Além disso, possibilitam a identificação de espécies forrageiras que podem exercer certo nível de controle sobre espécies indesejadas. Como consequência, poderão prover estruturas ou modelos que servem de base para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos.

Dentre as espécies que tem merecido maior destaque por parte da pesquisa científica estão as leguminosas *C. cajan* e *Stylosanthes*.

A espécie *Cajanus cajan* (L.) Millsp é considerada de origem indiana e atualmente é cultivada em mais de 50 países. No Brasil essa espécie vem apresentando valorização crescente, principalmente devido sua forma variada de utilização. Prova disso é que, principalmente na região nordeste, ela é empregada tanto na alimentação animal como na alimentação humana, em vista de seus altos teores de proteína no grão (20 a 22%) (WERNER,

1979; GODOY et al., 2004). Nas regiões sudeste e sul do país essa espécie tem sido bastante utilizada como adubo verde para recuperação de solos degradados, graças a sua elevada rusticidade e boa produção de massa (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010).

Outras forrageiras de destaque são as do gênero *Stylosanthes*, que conta com 48 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano. Segundo Costa (2010) das 48 espécies conhecidas, 13 existem exclusivamente no Brasil. Isso justifica a grande adaptação deste gênero as condições edafoclimáticas brasileiras. Atualmente três espécies de estilosantes tem concentrado a atenção dos pesquisadores brasileiros: *S. capitata* Vogel, *S. macrocephala* M.B.Ferreira & Sousa Costa e *S. guianensis* (Aubl.) Sw. (KARIA, et al., 2010). O estilosantes Campo Grande foi desenvolvido pela EMBRAPA e é formado pela mistura física de sementes das duas primeiras espécies. Essa leguminosa forrageira tem sido recomendada para o uso em consórcios de pastagens e apresenta produtividade em torno de 14 toneladas ha⁻¹ ano de MS e proteína bruta entre 12-18% (KARIA, et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fisiológica, estrutural e produtiva de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. quando cultivados na presença de níveis crescentes de palha da parte aérea de *B. humidicola* no substrato de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação, localizada no setor de Zootecnia do Instituto Federal de Mato Grosso IFMT - *Campus* Confresa durante o período de março a maio de 2012. A área está localizada na região nordeste do estado de Mato Grosso (10°38'38" S, 43°42'26" W), com altitude de 240m e precipitação média anual de 1.800 mm/ano (Figura 1). O clima da região é classificado como tropical com estação seca bem definida - Aw na classificação de Köppen.



Figura 1. Mapa indicando a localização da cidade de Confresa, na região nordeste do estado do Mato Grosso.. Fonte: Confederação Nacional de Municípios, 2011.

O solo de cultivo predominante na região se caracteriza como um Argissolo Vermelho Amarelo de textura franco arenosa. O solo coletado para o experimento foi retirado em pastagem cultivada com a gramínea *B. humidicola* já estabelecida, localizado na estação experimental de zootecnia do IFMT *Campus* Confresa. Em setembro de 2011, durante a coleta do solo, realizada na camada superficial do terreno 0-0,2m, foi realizada uma amostragem para caracterização de suas propriedades químicas, que em virtude da ausência de estrutura para realização destas análises no IFMT campus Confresa foi enviada para o Laboratório de Análise de Solos, Plantas e Resíduos da UFRRJ, onde a análise foi realizada segundo as rotinas analíticas daquele laboratório.

Com base nos resultados da análise do solo (Tabela 1), foi realizada uma aplicação basal de nutrientes (NPK) em todos os tratamentos para permitir o pleno desenvolvimento das leguminosas receptoras *C. cajan* e *Stylosanthes* spp.

Tabela 1. Resultados da análise da fertilidade do solo utilizado como substrato de crescimento durante o experimento. Amostragem em Setembro de 2011.

Prof. (m)	Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	K ⁺ (cmol _c /dm ³)	H+Al (cmol _c /dm ³)	V (%)	P ^(*) (mg/L)	M.O. ^(**) (g/kg)	pH água (1:2,5)
0,0- 0,2	1,0	0,5	0,13	0,7	70	5	10,15	5,2

(*) P disponível (Mehlich-1) (***) C orgânico (Walkey-Black) x 1,72.

A parte aérea de *B. humidicola* foi coletada na mesma pastagem onde foi coletado o solo. As plantas de *B. humidicola* foram cortadas rente ao solo e após secagem em estufa de

circulação forçada a 40° C, por 72 horas, o material foi triturado em moinho tipo Wiley, acondicionado em sacos plásticos e guardados em refrigerador até o momento do uso.

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação com ambiente semi-controlado, sendo ajustado como temperatura máxima 27°C e umidade relativa do ar 60% dentro da casa de vegetação.

Os tratamentos foram caracterizados por níveis crescentes de inclusão de palha da parte aérea (folhas e colmos) de *B. humidicola*, que foi adicionada ao substrato de cada vaso nas proporções de 0; 5; 10 e 20% p/p, totalizando quatro tratamentos com quatro repetições (n=16) para cada espécie de leguminosa avaliada. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Cada vaso, com capacidade para 8 L, recebeu 5 dm³ de substrato. Para homogeneização de cada amostra de solo com a palha de *B. humidicola*, referente a cada tratamento foi utilizado um saco plástico com capacidade para 50 litros, onde cada amostra foi misturada por dois minutos.

Não foram realizados drenos no fundo dos vasos para evitar não somente eventuais perdas dos nutrientes aplicados, como também das substâncias provenientes da planta doadora. As sementes de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. foram pré-germinadas em bandejas de células de isopor e transplantadas para os vasos quando apresentavam entre 3-5 cm de altura. Cada vaso recebeu um total de quatro plantas, sendo considerado cada vaso uma unidade experimental (parcela). Os vasos foram irrigados diariamente, de forma a manter o teor de umidade do substrato em 70% da capacidade de campo, que foi determinada através da saturação e pesagem dos vasos durante a calibração inicial do experimento.

A avaliação do efeito dos diferentes tratamentos sobre as características fisiológicas e estruturais de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. foi realizado através de leituras dos teores de clorofila *a*, *b* e total (*a+b*) nas folhas da planta receptora. As leituras de clorofila foliar foram realizadas sempre no folíolo central (médio) da primeira ou segunda folha do ápice para a base, utilizando-se um medidor eletrônico portátil marca ClorofiLOG modelo CFL 1030 (Falker- Automação Agrícola), que fornece valores de clorofila *a*, *b* e total (*a+b*). O aparelho emite feixes de luz em três comprimentos de onda. O primeiro feixe situa-se no pico de absorção da clorofila *a*, em 660nm, um segundo no pico da clorofila *b* em 635nm e o terceiro feixe no infravermelho próximo (880nm), e serve para compensar diferenças na espessura foliar e conteúdo de água.

A avaliação de características estruturais foi acompanhada por medições de altura de plantas, realizada com auxílio de régua milimetrada, da contagem do número de folhas por planta e da mortalidade de plantas. As avaliações foram realizadas a cada quatro dias.

A produção de massa seca dos componentes da planta foi avaliada 72 dias após o início do experimento. Os vasos foram levados ao laboratório, onde as plantas de cada unidade experimental foram cuidadosamente extraídas para realização da pesagem da massa fresca e, em seguida o material vegetal de cada tratamento foi posto a secar em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 65±5°C até massa constante.

Cada uma das leguminosas avaliadas deu origem a um experimento, não havendo comparação entre elas em virtude de se tratarem de espécies com hábitos de crescimento/desenvolvimento distintos (Feijão guandu= arbustivo e *Stylosanthes*= herbáceo) e por normalmente apresentarem utilizações distintas (feijão guandu= adubação verde e *Stylosanthes*= pastejo direto). Desta forma, os tratamentos consistiram da avaliação da resposta de cada espécie de leguminosa a quatro níveis de adição de palha de *B. humidicola* no substrato de cultivo. Cada tratamento contou com quatro repetições em um delineamento inteiramente casualizado.

Os dados foram analisados usando os procedimentos estatísticos do “*Statistical Analysis System*” (SAS). O PROC GLM com medidas repetidas no tempo foi utilizado para a

análise de variância (ANOVA). Os dados médios de altura, número de folhas por planta, índice de clorofilas, mortalidade de plantas e de produção de massa fresca e seca de cada espécie de leguminosa nos tratamentos propostos foram comparados pelo teste de Tukey (5%). Para a variável quantitativa, quando pertinente procedeu-se à análise de regressão linear, sendo os dados foram plotados em função do tempo de cultivo, para visualização de possíveis padrões de variação ao longo dos dias. A parametrização dessas tendências foi feita com auxílio dos modelos disponíveis no programa GraphPad Prism versão 5.0 for Windows (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inclusão de níveis crescentes de palha da parte aérea de *B. humidicola* promoveu a redução no desenvolvimento de *C. cajan* (Figura 2). Independentemente da quantidade, a incorporação de matéria seca de *B. humidicola* reduziu drasticamente a altura e o tamanho das folhas. É interessante observar que houve também a presença de clorose foliar, referenciada como um dos sintomas causados pela interação de aleloquímicos entre plantas (SOUZA et al., 1993). Embora existam poucas informações sobre a interação alelopática entre *B. humidicola* e leguminosas forrageiras em pastagens de ambientes tropicais, há evidências de efeito alelopático de plantas desse gênero (SOUZA-FILHO et al., 2005; BARBOSA et al., 2008). Portanto, em vista desses resultados pode-se concluir que possivelmente a palha de *B. humidicola* teve efeito fitotóxico sobre *C. cajan*.

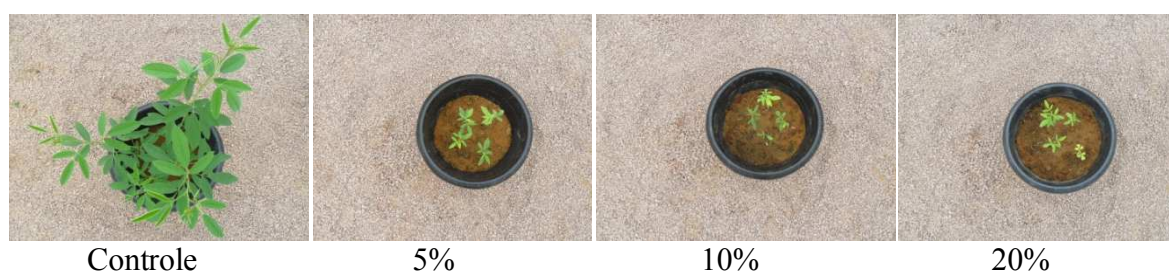


Figura 2. Aspecto geral do desenvolvimento inicial da leguminosa *Cajanus cajan* nos diferentes tratamentos de inclusão da palha da parte aérea (%) de *B. humidicola*. Imagens obtidas aos 42 dias após o transplante.

Em condições de casa de vegetação, Souza et al. (1993) estudaram a ocorrência de efeito alelopático de diversas espécies sobre *Eucalyptus grandis*. Os autores observaram alterações importantes no desenvolvimento inicial das mudas, tais como a diminuição no crescimento em altura, diminuição no diâmetro do caule, na produção de matéria seca e nos teores de clorofila foliar.

Resultados semelhantes, ou até mesmo mais pronunciados foram observados na leguminosa *Stylosanthes* spp. em resposta aos diferentes níveis de inclusão de *B. humidicola* (Figura 3).



Figura 3. Diferença geral observadas no desenvolvimento inicial da leguminosa *Stylosanthes* spp. nos diferentes tratamentos de inclusão da palha da parte aérea (%) de *B. humidicola*. Imagem obtida aos 42 dias após o transplante.

Na figura 4 são apresentados os valores médios de altura de plantas de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. para os diferentes tratamentos.

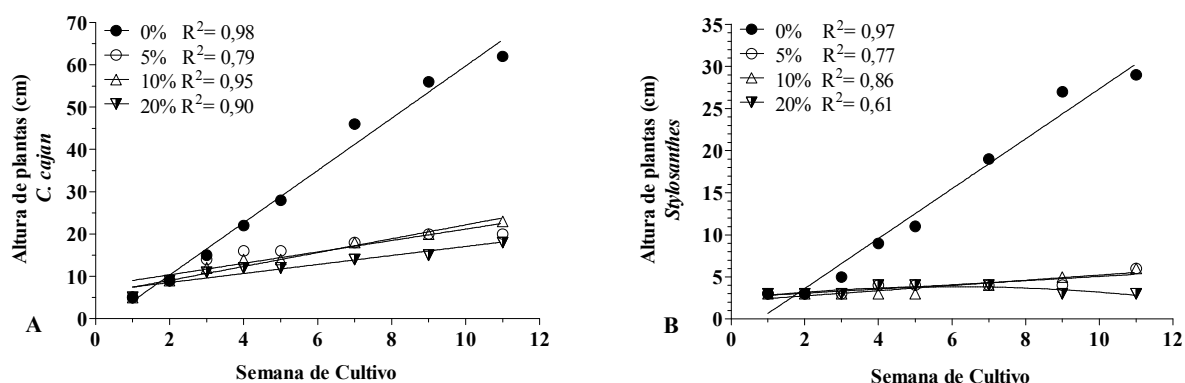


Figura 4. Altura de plantas de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B) em função da idade e porcentagem de inclusão de *B. humidicola*.

É possível observar que houve intensa redução no crescimento das plantas submetidas a palha de *B. humidicola* ($p < 0,05$). Vale ressaltar que as medições foram realizadas até a 11ª semana (72 dias). Durante esse período, tanto o crescimento de *C. cajan* como o de *Stylosanthes* apresentou tendência linear ($R^2 = 0,98$ e $0,97$ respectivamente) para o tratamento controle, que não teve adição de palha de *B. humidicola*. Já para os demais tratamentos os valores variaram de $R^2 = 0,79 - 0,95$ para feijão guandu e de $0,61 - 0,86$ para estilosantes.

Além de apresentarem menor altura de plantas, as leguminosas submetidas aos tratamentos com a presença da palha de *B. humidicola* também apresentaram menor número de folhas por planta ($p < 0,05$) (Figura 5).

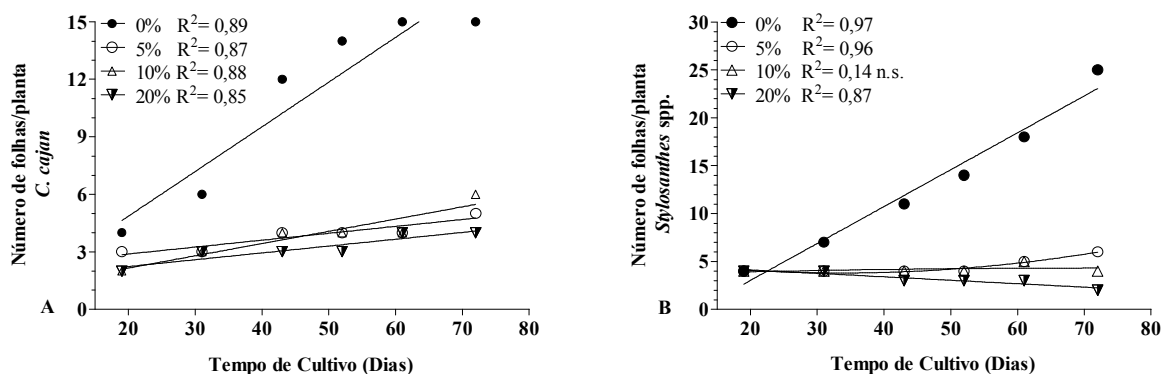


Figura 5. Número de folhas por planta de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B) em função da idade e porcentagem de inclusão de *B. humidicola*.

O número de folhas está diretamente relacionado ao Índice de Área Foliar (IAF), que representa a capacidade do dossel na interceptação da radiação fotossinteticamente ativa, em condições adequadas de cultivo. Além disso, diversos estudos já evidenciaram que a oferta de folhas verdes de leguminosas na pastagem constitui um parâmetro relevante no estudo do comportamento de consumo animal e na taxa de ingestão da pastagem pelos animais (PRACHE et al. 1998; BARRET et al. 2001; REGO et al., 2006).

Quanto à quantificação de índice de clorofilas foliares, houve prejuízo nas amostragens realizadas em *Stylosanthes*. Nesta cultivar, as avaliações não puderam ser realizadas, em virtude da intensa inibição que a leguminosa sofreu, sendo a área foliar

remanescente, insuficiente para se proceder a essa determinação analítica. De qualquer forma, foram quantificados os valores normais de: ICF T, ICF *a*, ICF *b* e da relação ICF *a*/ICF *b* para as plantas controle (Figura 6).

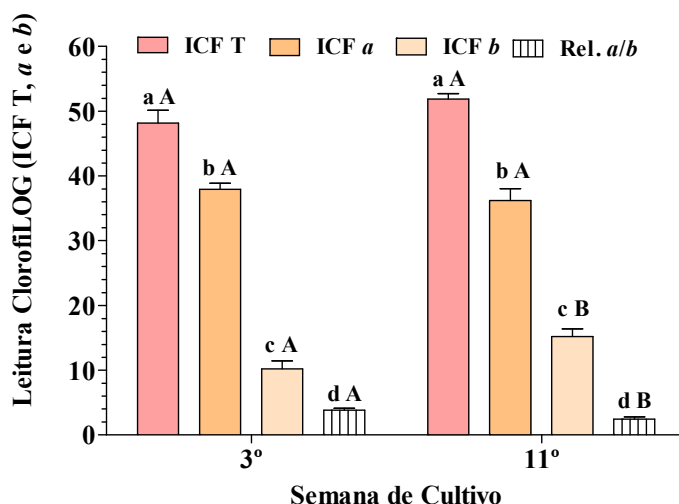


Figura 6. Teores de clorofila observados para a leguminosa *Stylosanthes* spp. cultivada sem a inclusão de palha de *B. humidicola* no substrato. Letras minúsculas iguais não diferem entre si na mesma semana de cultivo. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si para a mesma variável entre épocas de amostragem (semanas).

Os valores padrão de Clorofila total ($a+b$) não diferiram significativamente ao longo do tempo, assim como os valores de clorofila *a*. Para clorofila *b*, houve efeito de época, sendo observado pequeno aumento com o desenvolvimento das plantas. A relação clorofila *a/b* foi significativamente maior no início do cultivo, havendo com o desenvolvimento das plantas um incremento de clorofila *b*, em detrimento de clorofila *a*. Os valores observados para a média da relação clorofila *a/b* em *Stylosantes* spp. estão dentro da variação biológica esperada de 3:1 (STREIT et al., 2005).

Para a leguminosa *C. cajan*, apesar da dificuldade devido ao tamanho das folhas, foi possível executar as leituras de clorofila. Na figura 7 são apresentados os valores médios de leituras de clorofila total registrados no clorofilômetro portátil. Os resultados evidenciam que as doses crescentes de *B. humidicola* no substrato causaram uma redução significativa nos valores de clorofila total ($a+b$). Tais leituras foram realizadas em intervalos semanais, e se encontram apresentadas na figura 6. Houve diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (0% de inclusão) em relação aos demais tratamentos.

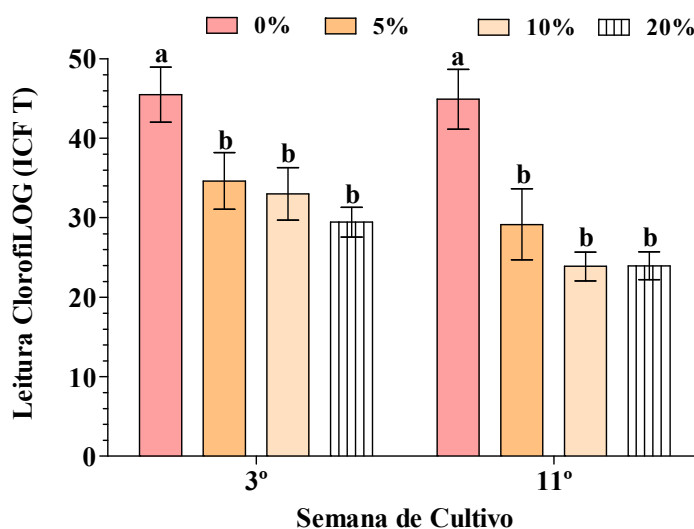


Figura 7. Valores médios e desvios padrão observados nas leituras de índice de clorofila total ($a+b$) para a leguminosa *C. cajan*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para os índices de clorofila *a* e de clorofila *b* houve redução nos valores de clorofila *a* e *b*, sendo essa queda mais acentuada ao longo do tempo e significativamente mais intensa para a clorofila *b* (Figura 8).

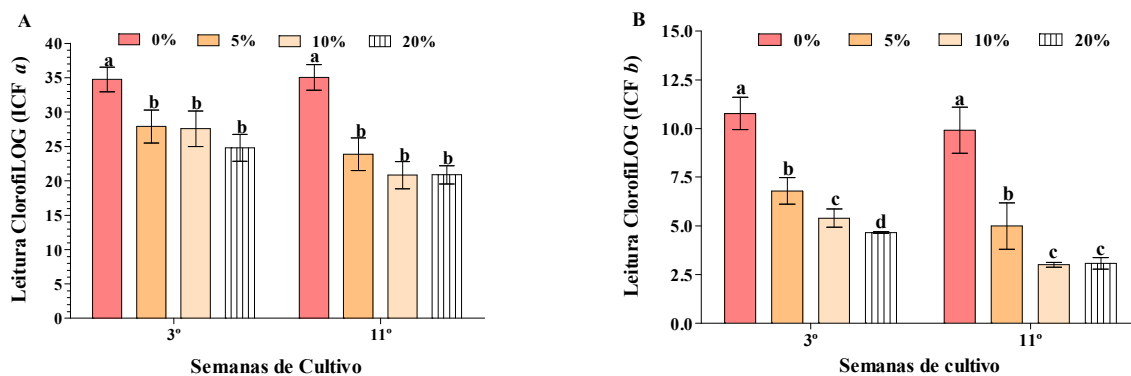


Figura 8. Valores médios e desvios padrão observados nas leituras de índice de clorofila *a* (A) e *b* (B) para a leguminosa *C. cajan*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A queda mais acentuada nos valores de clorofila *b*, em relação à registrada na clorofila *a* promoveu um aumento significativo na relação de clorofilas a/b (Clor a/b , Figura 9). A relação Clor a/b tem sido usada como um indicador metabólico/fisiológico sensível a vários estresses ambientais, incluindo variações na luminosidade, temperatura e salinidade (COSTA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011). Neste sentido, segundo os resultados obtidos, a inclusão dos níveis crescentes da palha de *B. humidicola* afetou fortemente essa relação. A redução do índice de clorofila *a* (29 e 41%) foi acompanhada de intensa redução do índice de clorofila *b*

(57 e 70%) para a terceira e décima primeira semana respectivamente, o que proporcionou um aumento significativo ($P < 0,05$) na relação Clor a/b . Esses resultados sugerem que aleloquímicos liberados pela palha da parte aérea de *B. humidicola* possam ter interferido no processo de biossíntese ou então na degradação das clorofilas na leguminosa *C. cajan*. Esse fato pode implicar no comprometimento dos processos fotossintéticos, com a consequente redução no crescimento do vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009).

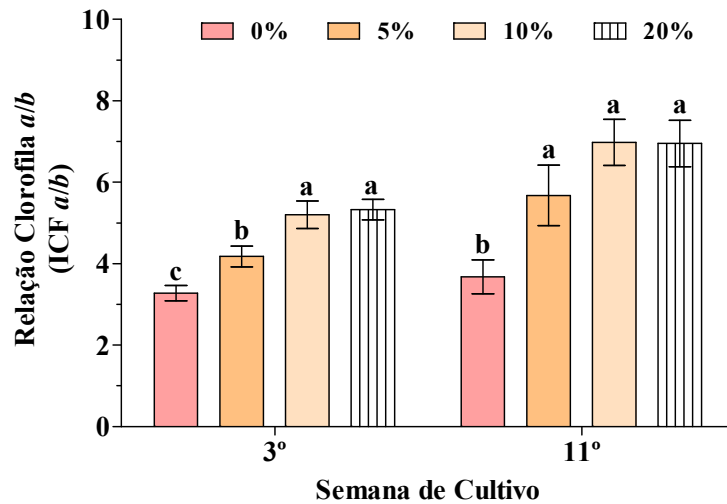


Figura 9. Variação na relação clorofila a/b para a leguminosa *C. cajan*, em função das diferentes inclusões de palha de *B. humidicola*. Os dados foram obtidos a partir de avaliação não destrutiva através de um clorofilômetro portátil na terceira e décima primeira semana após o transplante. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tais efeitos merecem ser melhor investigados, pois podem revelar um importante mecanismo de competição entre plantas. Nesse sentido, o clorofilômetro pode se constituir em importante ferramenta de estudo dentro das pesquisas em alelopatia (SILVA et al., 2012).

Nos tratamentos com adição da palha de *B. humidicola*, além do baixo porte, folhas com tamanho reduzido e descoloridas, foi observado uma elevada mortalidade das leguminosas (Figura 10).

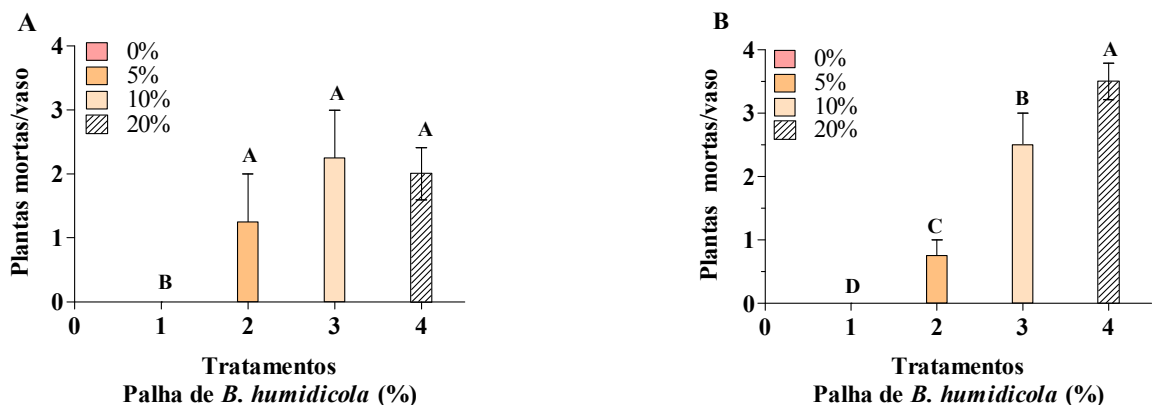


Figura 10. Mortalidade média da leguminosa *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* spp. (B), observada ao final do período experimental. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

No tratamento controle não foi registrada nenhuma morte de planta em ambas as espécies. Entretanto, nos demais tratamentos (5, 10 e 20% de inclusão) a mortalidade foi elevada para ambas as espécies, sendo: 31, 56 e 50 % para *C. cajan* e 19, 62 e 87%, *Stylosanthes*.

O efeito inibitório de substâncias presentes na palha de *B. humidicola* influenciou a produção de massa das leguminosas. Na figura 11 são apresentados os valores de massa fresca de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp. submetidos aos diferentes níveis de inclusão de palha de *B. humidicola* após o final do período das avaliações, que ocorreu após 72 dias do transplante das mudas.

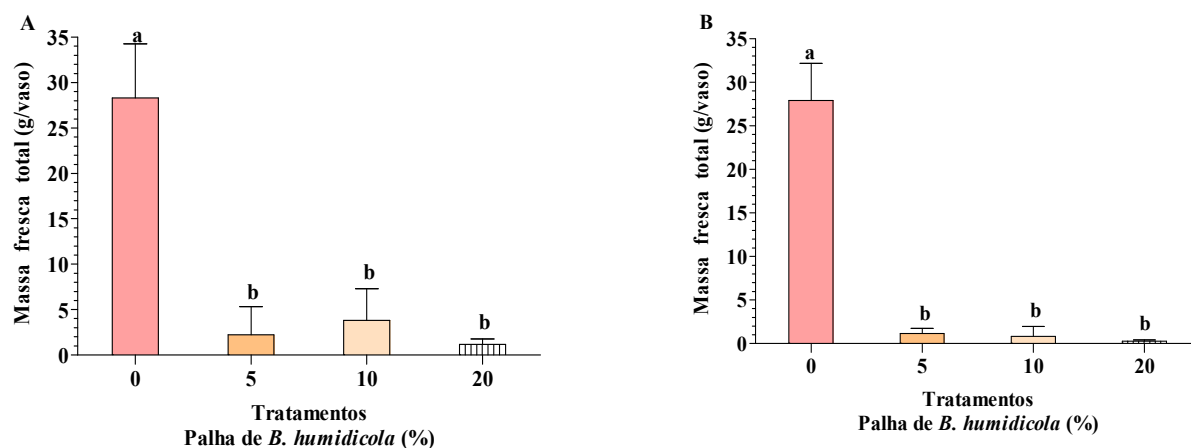


Figura 11. Produção de Massa fresca de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* (B) submetido a níveis de inclusão de *B. humidicola*. Amostragem realizada após 72 dias de cultivo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Quanto a análise estatística, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o tratamento controle com os respectivos níveis de inclusão de *B. humidicola*. Não foi observada diferença entre os níveis de inclusão de palha de *B. humidicola* em ambas as espécies de leguminosa. Estes resultados evidenciam que mesmo a menor dose de inclusão de palha de *B. humidicola* promoveu intensa redução no desenvolvimento das plantas. Desta forma, adquirem importância especial, estudos que avaliem o efeito de métodos de introdução, já que conforme a quantidade de massa de *B. humidicola* acumulada na pastagem, a escolha de métodos que incluem a incorporação desta gramínea ao solo, como por exemplo a gradagem, pode resultar em baixo nível de desenvolvimento inicial durante o estabelecimento e conseqüentemente baixa persistência, conforme resultados observados por Ribeiro (2006) com a espécie *Stylosanthes* cv Campo Grande.

O bom desempenho animal em pastagens consorciadas está diretamente relacionado a participação da leguminosa na composição do pasto (PEREIRA, 2002; RIBEIRO, 2006). Desta forma é importante que a leguminosa apresente grande produção de massa fresca e seca.

Na figura 12 são apresentados os valores de massa seca de ambas leguminosas para os diferentes tratamentos.

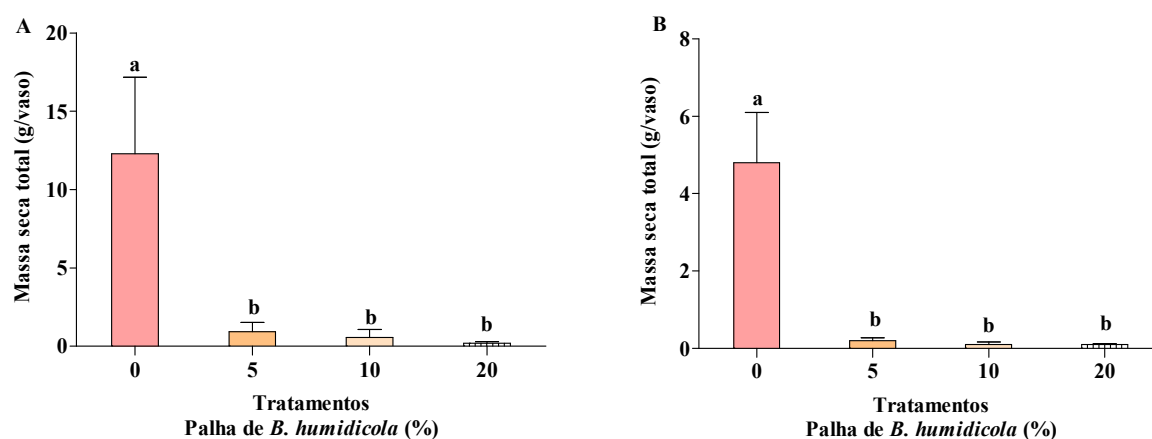


Figura 12. Produção de Massa seca de *C. cajan* (A) e *Stylosanthes* (B) submetido a níveis de inclusão de *B. humidicola*. Amostragem realizada após 72 dias de cultivo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Neste aspecto, é interessante observar que mesmo o menor nível de inclusão (5%) de *B. humidicola* no substrato de cultivo resultou em uma produção 13 vezes inferior ao observado para o controle de *C. cajan*. Da mesma forma, em *Stylosanthes* spp. a redução comparativa média do tratamento de menor inclusão em relação ao controle foi de 10 vezes menos. Esses resultados demonstram o potencial fitotóxico destas gramíneas e traduzem a elevada agressividade com que estas plantas competem dentro do ambiente de pastagem, resultando em elevada mortalidade de plantas, baixo desenvolvimento e consequentemente menor produção de massa.

Vale ressaltar que durante o experimento as plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob ambiente semi-controlado, não havendo registro de pragas e deficiência hídrica. Portanto, as plantas se desenvolveram em ambiente livre dos fatores de comuns de competição, geralmente encontrados em condições de consórcio de pastagem. Desta forma, em ambientes livres de competição por fatores abióticos (água, luz e nutrientes) e com elevadas quantidades de massa de *B. humidicola* incorporada na camada superficial do solo, a leguminosa terá menor chance de se estabelecer devido a fitotoxicidade dos resíduos da gramínea. Provavelmente o efeito em conjunto dos fatores abióticos e bióticos (alelopatia) são os grandes responsáveis pela dificuldade no estabelecimento e na persistência de leguminosas tropicais em consórcios com *B. humidicola* (RIBEIRO, 2006; BARCELLOS et al., 2008; VALENTIM, 2010).

Apesar do baixo desenvolvimento das leguminosas estarem relacionados aos efeitos alelopáticos da *B. humidicola*, deve-se ressaltar o efeito inibitório da nitrificação do nitrogênio por parte de substâncias liberadas por esta gramínea. Este evento pode ter provocado a maior concentração dos teores de amônio no solo, o que pode ter levado ao resultado negativo no desenvolvimento dessas leguminosas, diante da toxicidade desta molécula para as leguminosas. Outra hipótese que não deve ser descartada, embora menos provável, pois houve a adubação nitrogenada, é a imobilização do N durante a decomposição da matéria seca pelos microorganismos, o que pode ter indisponibilizado este nutriente para o desenvolvimento das plantas em cultivo.

4 CONCLUSÕES

A presença de palha de *B. humidicola* no substrato de cultivo inibiu de modo intenso o crescimento e a produção de massa seca de *C. cajan* e *Stylosanthes* spp.

Leituras de clorofila traduzem claramente as diferenças visuais observadas na coloração das lâminas foliares da leguminosa *C. cajan* nos diferentes níveis de inclusão da palha de *B. humidicola*. Em particular, a relação clorofila *a/b*, pode ser utilizada como importante índice do efeito alelopático exercido pelo capim *B. humidicola* sobre a leguminosa *C. cajan*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, E.G.; PIVELLO, V.R.; MEIRELLES, S.T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the brazilian cerrados. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51 n.4, p.825-831, 2008.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.spe, 2008.

BARRET, P.D.; LAIDLAW, A.S.; MYNE, C.S. et al. Pattern of herbage intake rate and bite dimensions of rotationally grazed dairy cows as sward height declines. **Grass and Forage Science**, v.56, p.362-373, 2001.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A. & DESCHAMPS, F. C. Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex. A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 3, p. 519-528, 2004.

CORREA, T.; MENDONÇA, C.G. Efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sobre o desenvolvimento de estilosantes Campo Grande. **In: Anais... Encontro de Iniciação Científica**, v.1, Dourados, 2010.

COSTA, D.P.; SANTOS, A.C.C.; PEREIRA, A.P.P.; AZEVEDO NETO, A.D. Teores de clorofila, sódio e potássio em genótipos de girassol sob estresse salino. **In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC**, 2010, Cruz das Almas. **Anais ... SBPC**, 2010.

FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa MG: Ed. UFV, 2010. 537p.

GODOY, R.; FUSHITA, A.T.; SOUZA, F.H.D. Caracterização de onze linhagens puras selecionadas de guandu oriundas de São Carlos, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2206-2213, 2004.

KARIA, C.T.; ANDRADE, R.P.; FERNANDES, C.D.; SCHUNKE, R.M. Gênero *Stylosanthes*. **In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Eds). Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p.366 - 401.

MATTOS, H.B.; PEDREIRA, J.V.S. Crescimento estacional de oito leguminosas forrageiras de clima tropical. **Boletim da Indústria Animal**, v.41, p.145-157, 1984.

MESQUITA, E. E.; FONSECA, D. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; PEREIRA, O. G.; PINTO, J. C. Efeitos de métodos de estabelecimento de braquiária e estilosantes e de doses de calcário, fósforo e gesso sobre alguns componentes nutricionais da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2186-2196, 2002.

MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting**. Oxford: Oxford University Press, 2004. 352p.

PEREIRA, J.M. Leguminosas forrageiras em sistemas de produção de ruminantes: Onde estamos ? Para onde vamos ? In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM , 2002, **Anais...** Viçosa: UFV, 2002, p. 109-147.

PRACHE, S.; GORDONS, I.J.; ROOK, A.J. Foraging behavior and diet selection in domestic herbivores. **Annes Zootechnie**, v.47, p.1-11, 1998.

REGO, F.C.A.; DAMASCENO, J.C.; MARTINS, E.N.; CORTES, C.; FUKUMOTO, N.M.; ROESHI, L.; DOS SANTOS, G.T. Influência de variáveis químicas e estruturais do dossel sobre a taxa de ingestão instantânea em bovinos manejados em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.691-698, 2006.

RIBEIRO, R.C. **Estabelecimento de Leguminosas em Pastagens de *Brachiaria humidicola*: Variações Sazonais de Atributos do Dossel Vegetativo**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 53p. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia), 2006. Orientador: ROSSIELLO, R.O.P. RICE, E.L. **Allelopathy**. 2º. ed. New York: Academic, 1984. 422 p.

SAS Institute. **Statistical Analysis System SAS/STAT Software Version 9.0**, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002.

SILVA, A.S.; CORREIA, A.P.; SANTOS, N.A.; LOPES, F.A.S.; RIBEIRO, R.C.; CARDOSO, P.H.F.; SILVA, R.A.; BARBIERI JUNIOR, E. Influência da palha de *Brachiaria humidicola* nas respostas fisiológicas durante o desenvolvimento inicial de *Cajanus Cajan*. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. Cuiabá - MT, 2012. **Anais...** Cuiabá: a importância da Zootecnia para a segurança alimentar, 2012. (CD-ROM).

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MAIOMI-RODELLA, R.C.S. Avaliação do efeito alelopático de 18 espécies de plantas daninhas sobre o crescimento inicial de *Eucalyptus grandis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 19., 1993. **Anais...** Londrina: s.n, 1993. p.25.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Viçosa - MG, v.23, n.1, p. 25-32, 2005.

STREIT, M.N.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

VALENTIM, J.F. Outras leguminosas forrageiras de importâncias econômica para a pecuária brasileira. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Eds). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p.403-458.

VIEIRA, T.O.; LAGE-PINTO, F.; RIBEIRO, D.R.; ALENCAR, T.S.; VITÓRIA, A.P. Estresse luminoso em plântulas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*, Lecythidaceae): monitoramento da capacidade de aclimação fotossintética sob duas intensidades de luz. **Vértices**, v.13, n.3, p.129-142, 2011.

WARDLE, D.A. Allelopathic in New Zealand pasture grassland ecosystem. **New Zealand Journal Experimental Agriculture**, v.15, p. 243-255, 1987.

WERNER, J.C. O potencial do guandu (*Cajanus cajan* L. Mill sp) como planta forrageira. **Zootecnia**, v.17, n.2, p.73-100, 1979.

ZHANG, D., ZHANG, J., YANG, W. & WU, F. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. **Ecol. Res.**, v.25, p.13-23, 2010.