



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR-
PPBM

MARIA ELIZETE MACHADO GENERINO

EFEITO ALELOPÁTICO E CITOGENÉTICO DO EXTRATO AQUOSO DE
***Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (APOCYNACEAE) SOBRE SEMENTES E**
PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)

CRATO-CE

2014

Generino, Maria Elizete Machado.
G326e Efeito alelopático e citogenético do extrato aquoso de
Calotropis procera (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes
e plântulas de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae)/ Maria Elizete Machado
Generino. – Crato-CE, 2014
109p.; il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional
do Cariri-URCA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva

1. Alelopatia; 2. Citogenética; 3. HPLC;
I. Título.

CDD: 581.1

MARIA ELIZETE MACHADO GENERINO

**EFEITO ALELOPÁTICO E CITOGENÉTICO DO EXTRATO AQUOSO DE
Calotropis procera (Aiton) W.T.Aiton (APOCYNACEAE) SOBRE SEMENTES E
PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri-URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva

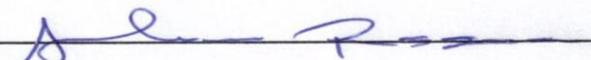
**CRATO – CE
2014**

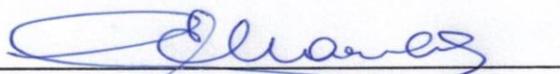
MARIA ELIZETE MACHADO GENERINO

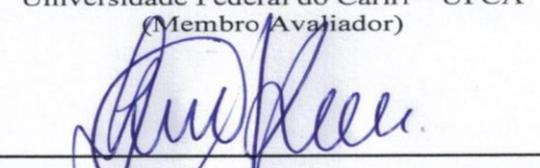
**EFEITO ALELOPÁTICO E CITOGENÉTICO DO EXTRATO AQUOSO DE
Calotropis procera (Aiton) W.T.Aiton (APOCYNACEAE) SOBRE SEMENTES E
PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)**

Dissertação submetida e aprovada pela Banca Examinadora em 22/12/2014

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Orientadora)


Prof. Dra. Cláudia Araújo Marco
Universidade Federal do Cariri – UFCA
(Membro Avaliador)


Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Membro Avaliador)


Prof. Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Membro Suplente)

DEDICATÓRIA

A minha querida e amada mãe Antônia Francisca e ao meu amado marido João Dantas, por estar sempre ao meu lado me apoiando e me dando força para seguir em frente sem jamais desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado a dádiva da vida e por ser minha fortaleza em todos os momentos;

A minha Orientadora **Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva** por ter me aceitado como orientanda, pela sábia orientação, pela experiência, por ter me ensinado TUDO que sei sobre pesquisa, pela paciência, pela confiança, pelo exemplo de vida, pelo amor que tem ao próximo;

Aos **Coordenadores do Curso** do programa de Pós Graduação em Bioprospecção pelo apoio e compromisso;

Ao **Corpo Docente** e as **Secretárias** do programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular pela ótima convivência durante o curso;

A todos meus **colegas de turma**, pela troca de experiência, amizade, companheirismo, afeição, pelas conversas e risadas que tornaram o mestrado muito mais divertido.

A todos do Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima-**HCDAL** e Laboratório de Botânica Aplicada-**LBA** pela amizade, parceria e cumplicidade. Pela ajuda em campo e em laboratório, Obrigada por tornar esse trabalho possível;

Aos Coordenadores dos Laboratórios de Pesquisa de Produtos Naturais-**LPPN** e de Microbiologia e Biologia Molecular-**LMBM** por terem contribuído na realização de alguns experimentos dessa dissertação;

Ao Professor **Luiz Marivando Barros** e a **Universidade Federal de Santa Maria**, pelo apoio e pela contribuição na realização dos testes de HPLC;

Aos membros da **Banca Examinadora** pelas preciosas sugestões e disponibilidade;

Aos **funcionários da URCA**, em especial a Sylvanna, pela ajuda, pelas conversas agradáveis, amizade, palavras de carinho e companheirismo. E ao seu Luiz por ter me ajudado no campo e pela preocupação.

A Coordenação da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-**FUNCAP** pela concessão da bolsa de estudo;

A todos os meus familiares, **irmãs, tios, sobrinhos, cunhados, primas e em especial a minha mãe**, por terem me apoiado sempre, pelos momentos de descontração, pela motivação, pelo amor, carinho e união;

Ao meu amado marido **João Dantas**, pelo amor, companheirismo, por ter paciência nas minhas decisões, pelo apoio, carinho, pelos momentos de descontração, pela confiança, compreensão, e por sempre me incentivar em todo que faço;

Aos meus **amigos**, pelo companheirismo, atenção, paciência, motivação, pelo afeto, e pelos grandes momentos de descontração e animação.

A todos muito obrigada!

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando... Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu...”

Sarah westphal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química atrazina.....	20
Figura 2. Aspecto geral de <i>Calotropis procera</i> na localidade Guaribas, Crato-CE.....	22
 ARTIGO 1	
Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. submetidas ao extrato das folhas de <i>Calotropis procera</i>	44
Figura 2: Comprimento dos caulículos de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao extrato das folhas de <i>Calotropis procera</i>	45
Figura 3: Comprimento das radículas de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao extrato das folhas de <i>Calotropis procera</i>	45
Figura 4: Índice Mítico de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao extrato das folhas de <i>Calotropis procera</i>	46
Figura 5: Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de folhas de <i>Calotropis procera</i> . Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico 8), luteolina (pico 9) e apigenina (pico 10).....	48
 ARTIGO 2	
Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao extrato do caule de <i>Calotropis procera</i>	68
Figura 2: Comprimento dos caulículos de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao extrato do caule de <i>Calotropis procera</i>	60

Figura 3: Comprimento das radículas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*.....**69**

Figura 4: Índice Mítico de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*.....**70**

Figura 5: Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de folhas de *Calotropis procera*. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico 8), luteolina (pico 9) e apigenina (pico 10).....**72**

ARTIGO 3

Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis procera*.....**89**

Figura 2: Comprimento dos caulículos de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis procera*.....**90**

Figura 3: Comprimento das radículas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis procera*.....**90**

Figura 4: Índice Mítico de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis procera*.....**91**

Figura 5. Efeito citotóxico do herbicida atrazina em células de *Lactuca sativa*: (A) micronúcleos, (B) ponte anafásica, (C e D) quebra cromossômica na metáfase, (E) anáfase multipolar.....**92**

Figura 6. Efeito citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* a 50% em células de *Lactuca sativa*: (A) desorganização da metáfase, (B) anáfase multipolar, (C) aderência cromossômica na metáfase.....**93**

Figura 7. Efeito citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* a 100% em células de *Lactuca sativa*: (A) quebra e perda cromossômica na metáfase, (B) atraso cromossômico, (C) aderência cromossômica na metáfase, (D) ponte anafásica.....**93**

Figura 8: Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de folhas de *Calotropis procera*. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico 8), luteolina (pico 9) e apigenina (pico 10).....**93**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA da folha de *Calotropis procera*.....**43**

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EBA da folha de *Calotropis procera*.....**47**

Tabela 3: Composição química do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera*.....**49**

ARTIGO 2

Tabela 1: Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA do caule de *Calotropis procera*.....**68**

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EBA do caule de *Calotropis procera*.....**71**

Tabela 3: Composição química do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera*.....**72**

ARTIGO 3

Tabela 1: Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA da raiz de *Calotropis procera*.....**89**

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EBA da raiz de *Calotropis procera*.....**94**

Tabela 3: Composição química do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera*.....**96**

RESUMO

Alelopatia é um fenômeno que pode acarretar efeitos positivos ou negativos em relação à germinação de sementes e/ou desenvolvimento de plântulas nos diversos ambientes tornando possível a descobertas de bioherbicidas a serem usados no combate a plantas daninhas sem tantos efeitos negativos ao ambiente. Assim, no presente trabalho objetivou-se avaliar as atividades biológicas e citotóxicas do extrato aquoso das partes aérea e subterrânea de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae), sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L. O experimento constou de quatro tratamentos, inerentes ao extrato de *C. procera* a 100%, 75%, 50% e 25% de concentração e dois grupos Controle. Cada tratamento constou de cinco repetições com 20 sementes de *Lactuca sativa*. O bioensaio foi conduzido em caixas gerbox tendo por substrato duas folhas de papel germitest, umedecidas com 3 mL do substrato nas diversas concentrações constando o Controle 1 de 3 mL de água destilada e o Controle 2 de 3 mL de herbicida atrazina SIPTRAN®. O experimento foi realizado em Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por sete dias em temperatura constante de 25°C. Os parâmetros analisados foram Porcentagem de Germinação (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), desenvolvimento do caulículo e radícula, necrose da radícula, e análises do Índice Mitótico e registro de alterações cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Regressão Polinomial. Foi realizada ainda a prospecção fitoquímica do extrato bruto aquoso de *C. procera* e análise em HPLC. O EBA da folha, do caule e da raiz de *C. procera* não afetou a germinação de sementes de *Lactuca sativa*. O IVG das sementes submetidas ao EBA da folha e da raiz foi estimulado e ao do caule inibido. O desenvolvimento do caulículo das plântulas submetido ao extrato das folhas e do caule foi estimulado em todas as concentrações, porém os submetidos ao extrato da raiz foram reduzidos. O comprimento da radícula de plântulas expostas ao EBA da folha, do caule e da raiz foi afetado negativamente. O Índice Mitótico foi estimulado nas células das radículas submetidas ao EBA da folha e do caule e inibido em presença do EBA da raiz, com ocorrência de necrose. As células das radículas das plântulas submetidas ao extrato da raiz apresentaram alterações cromossômicas dos tipos: quebra cromossômica e ponte anafásica. A análise fitoquímica indicou que os três extratos possuem flavonoides, sendo que os resultados do HPLC mostraram que os extratos da folha e do caule possuem teores elevados do composto campferol, e o EBA da raiz um teor elevado do composto quercetina. Portanto o efeito alelopático do extrato aquoso das folhas, do caule e da raiz de *C. procera* observado sobre *Lactuca sativa* pode estar associado à ação de um único composto ou pelo sinergismo dos mesmos.

Palavras-chave: Alelopatia. Citogenética. HPLC

ABSTRACT

Allelopathy is a phenomenon that can lead to positive or negative effects on the germination and/or seedling development in different environments making it possible to mycoherbicides findings to be used to combat weeds without so many negative effects on the environment. In the present work aimed to evaluate the biological and cytotoxic activities of the aqueous extract of the aerial and underground parts of *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae) on seeds and seedlings of *Lactuca sativa* L. The experiment consisted of four treatments, *C. procera* inherent to extract 100%, 75%, 50% and 25% concentration, and two control groups. Each treatment had five replicates of 20 seeds of *Lactuca sativa*. The bioassay was conducted in a seedling box having the substrates germitest two sheets of paper, wetted with 3 ml substrate in various concentrations Control 1 consisting of 3 ml of distilled water and 3 ml Control 2 SIPTRAN® atrazine herbicide. The experiment was conducted in germination chamber BOD with a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness for seven days in constant temperature of 25 ° C. The parameters analyzed were percentage of germination (%), Germination Speed Index (GSI), development of caulículo and radicle, necrosis of the radicle, and analysis of Mitotic Index and registration of chromosomal changes. Data were submitted to polynomial regression analysis. Yet it was carried out phytochemical screening of the aqueous crude extract of *C. procera* and HPLC analysis. EBA leaf, stem and root of *C. procera* did not affect the germination of *Lactuca sativa* seeds. The IVG seeds submitted to the EBA leaf and root was stimulated and inhibited the stem. The development of caulículo seedlings submitted to the extract of the leaves and stem was stimulated at all concentrations, but the undergone root extract were reduced. The length of the primary root of seedlings exposed to EBA leaf, stem and root was negatively affected. The Mitotic Index was stimulated in cells of rootlets submitted to the EBA leaf and stem and inhibited in the presence of the root EBA, with the occurrence of necrosis. The cells of rootlets of seedlings subjected to root extract showed chromosomal aberrations types: chromosomal breakage and anafásica bridge. Phytochemical analysis indicated that all three extracts possess flavonoids, and the HPLC results showed that leaf and stem extracts have high levels of kaempferol compound and EBA root a high content of the compound quercetin. So the allelopathic effect of aqueous extract of the leaves, stem and root of *C. procera* observed on *Lactuca sativa* can be associated with the action of a single compound or the synergism of them.

Keywords: Allelopathy. Cytogenetics. HPLC

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELA	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Alelopatia: história e conceito.....	16
2.2. Produção e meios de liberação dos aleloquímicos.....	17
2.3. Uso de herbicidas e consequências.....	19
2.4. O herbicida Atrazina.....	20
2.5. Bioherbicidas e alelopatia	21
2.6. Descrição botânica e características morfológicas da espécie em estudo.....	22
2.7. Atividade biológica de <i>Calotropis procera</i>	23
REFERÊNCIAS	25
3. ARTIGO 1 - Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso das folhas de <i>Calotropis procera</i> (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L.	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODO.....	37
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
4. ARTIGO 2 - Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso do caule de <i>Calotropis procera</i> (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L.	60

RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODO.....	63
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	73

5. ARTIGO 3 - Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.....77

RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODO.....	82
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

A alelopatia é vista como uma influência, positiva ou negativa, entre plantas a partir de aleloquímicos produzidos em várias partes destas. Os aleloquímicos têm origem do metabolismo secundário e sua produção é regulada por diversos fatores ambientais, como a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e microrganismos presentes (CHOU; KUO, 1986; CARMO et al., 2007).

As plantas daninhas possuem capacidade de inibir o desenvolvimento de outras plantas, e trazem diversos prejuízos a culturas comerciais, levando os agricultores a utilizar herbicidas sintéticos para combatê-las, a exemplo do herbicida atrazina que segundo Mendonça (2014), é amplamente utilizado em diversas culturas anuais e perenes, como milho, cana-de-açúcar, sorgo, café, cacau, banana, chá, abacaxi, seringueira e sisal.

Muito embora este controle químico implique em diversos prejuízos, como a poluição do solo e das águas, risco a saúde humana, resistência em espécies daninhas. Uma alternativa que vem sendo estudada, com o propósito de complementar os métodos tradicionais de manejo, minimizando o uso de herbicidas, é a ação alelopática, inerente a diversas espécies vegetais, que através da liberação de substâncias (aleloquímicos) acarreta menos riscos à saúde humana e ao ambiente somado à demanda crescente de produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos (CORRÊA; SALGADO, 2011).

Assim, o crescente desejo de diminuir o uso de insumos químicos sintéticos nos sustentabilidade dos sistemas de produção e da conservação da vegetação natural, pois representam uma alternativa biológica com ação específica e menos prejudicial ao meio ambiente (TUR et al., 2010).

Como os compostos alelopáticos afetam diversos processos, tais como a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, entre outros (EINHELLIG, 1996), os bioensaios são de fundamental importância, pois são realizados por biomarcadores, como *Lactuca sativa* L. (alface), que segundo Silva et al. (2003) são úteis por se tratar de sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico.

Calotropis procera (Aiton) W. T. Aiton, pertencente à família Apocynaceae, é muito conhecida por seus efeitos medicinais atribuídos em maior parte a seus compostos polifenólicos (WILLIAMS et al., 2004). Apresenta propriedades fitoterápicas e é utilizada, principalmente, como anti-inflamatória (ARYA; KUMAR, 2005). Diferentes partes de *C. procera* têm sido usadas como fitoterápicos em muitas enfermidades na tradicional medicina indiana (TANIRA et al., 1994). Porém, Sharma et al. (1934), relataram que o látex da planta é muito irritante e corrosivo.

Muitos estudos voltados para as potencialidades farmacológicas de *Calotropis procera* são realizados na atualidade, em virtude de suas flores, folhas, raízes e látex serem muito utilizados na farmacopéia popular no tratamento de doenças de pele, para conter irritações e aliviar a dor. Enquanto do ponto de vista médico-legal, serem usadas para abortos, suicídios, homicídios, devido à presença em seu soro de substâncias tóxicas (TOMAR et al., 1970).

Devido à reconhecida ação farmacológica de *C. procera*, além de sua toxicidade, atribuída a presença de flavonoides, compostos comprovadamente com potencial alelopático, na presente pesquisa objetivou-se avaliar a atividade biológica e citotóxica do extrato aquoso em diversas concentrações de partes aérea e subterrânea de *C. procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*. Além de investigar quais metabólitos secundários estão presentes nos extrato das diferentes partes da referida espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alelopatia: história e conceito

Embora a alelopatia seja uma ciência recente, o primeiro registro de efeito alelopático foi relatado no século V a.C. por Demócrito que se referia à ação inibitória provocada por algumas plantas sobre outras (ALMEIDA, 1985). Depois, Theophrastus (300 a.C.), um discípulo de Aristóteles, observou que *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico) não permitiam que outras plantas se estabelecessem no solo, além de afetar o desenvolvimento de plantas invasoras (RICE, 1984).

Plínio no século 1 d.C., relatou os efeitos negativos de *Juglans nigra* e *J. regia* sobre o desenvolvimento das plântulas cultivadas em sua proximidade (VYVYAN, 2001). E um documento japonês, escrito há cerca de 300 anos, demonstrou evidências

de prováveis efeitos alelopáticos atribuídos a *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. (FERREIRA; AQUILA, 1999).

Em 1882, De Candolle teorizou que as raízes das plantas teriam além da função de absorção, a de excreção, e seus excrementos seriam venenosos para plantas da mesma espécie, gênero ou família, porém no final do século XIX sua teoria foi contestada e abandonada (MANO, 2006). Em 1909, trabalhos produzidos por Shorey, comprovou pela primeira vez a existência de toxinas em solos antes cultivados e deixados em pousio (ALMEIDA, 1990).

A despeito de todas as evidências de um fenômeno que levava certas plantas em presença de outras a não se reproduzirem através da germinação de suas sementes ou não desenvolverem suas plântulas, somente em 1937 o termo "alelopatia" foi criado, pelo pesquisador alemão Hans Molisch, com a reunião das palavras gregas "*allélon*" e "*pathos*", que significam respectivamente, *mútuos* e *prejuízo*. Segundo Molisch, alelopatia é "a capacidade de as plantas, produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento" (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Uma das definições mais aceitas para a alelopatia é atribuída a *International Allelopathy Society* (IAS) que considera o fenômeno como "a ciência que estuda processos envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos" (MACÍAS et al., 2007). Sendo caracterizada como uma nova ciência que se torna cada dia mais importante na maioria dos países desenvolvidos (MACÍAS et al., 2006).

Os aleloquímicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas sendo responsáveis pela transmissão de informações entre plantas, além de atuarem nas interações entre planta-planta, planta-inseto e planta-microrganismo (BOGATEK; GNIAZDOWSK; ZAKRZEWSKA, 2006).

Várias são as classes de metabólitos secundários encontrados nas plantas como os flavonoides, alcaloides, taninos, fenóis, entre outros.

2.2. Produção e meios de liberação do aleloquímicos

A produção e acúmulo de aleloquímicos podem ocorrer em diferentes partes da planta tais como: raiz, caule, folha, flor e fruto havendo uma tendência de acúmulo nas

folhas (SOUZA FILHO et al. 2009). A liberação desses compostos secundários se dá através de processos como a exsudação radicular, lixiviação, volatilização e decomposição de resíduos.

Na exsudação radicular um grande número de compostos alelopáticos são liberados na rizosfera circundante e podem atuar direta ou indiretamente nas interações planta-planta e na ação de microrganismos (INDERJIT; DAKSHINI, 1992; 1994). Putnam (1983) relata que a exsudação pode ocorrer também pelos frutos.

Na lixiviação ocorre a remoção de substâncias químicas das partes aéreas e da raiz das plantas vivas ou mortas por ação da água da chuva, orvalho ou neblina (ALVES, 1992). Na volatilização compostos aromáticos são volatilizados das folhas, flores, caules e raízes, e podem ser absorvidos por outras plantas como o gás carbônico (CO_2), a amônia (NH_3), o etileno e os terpenóides (INDERJIT; DAKSHINI, 1992; 1994).

Na decomposição de resíduos, partes da planta caem no solo e por ação de microrganismos e das condições climáticas liberam substâncias aleloquímicas (MALHEIROS; PERES, 2001). Segundo Almeida, Zucolotoz e Zetum (2008) esse tipo de processo permite a liberação de um grande número de compostos que impõem toxicidade aos microrganismos vizinhos, tais como glicosídeos cianogênicos, ácidos fenólicos, agropirenos, cumarinas e flavonoides.

Os compostos alelopáticos após serem liberados podem causar efeitos diretos ou indiretos sobre outras plantas. Efeitos diretos são caracterizados por alterações no metabolismo e crescimento da planta, afetando: estruturas citológicas e ultra-estruturais; hormônios, tanto alterando suas concentrações quanto o balanço entre os diferentes hormônios; membranas e sua permeabilidade; absorção de minerais; movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; respiração; síntese de proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução; material genético, induzindo alterações no DNA. Já os efeitos indiretos compreendem alterações em propriedades do solo, interferindo na absorção de nutrientes, como também na população e atividade de micro-organismos (PIRES; OLIVEIRA, 2001).

Os procedimentos utilizados para avaliação das atividades alelopáticas inerentes as diferentes espécies são os bioensaios, nos quais podem ser avaliados parâmetros globais como germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas ou plantas adultas e parâmetros mais específicos, tais como, a atividade de alguns processos

fisiológicos, como, por exemplo, fotossíntese, respiração e conteúdo de clorofila (SOUZA- FILHO; ALVES, 2002).

2.3. Uso de herbicidas e consequências

Com o crescente avanço da agricultura, principalmente devido sua importante participação na economia de muitos países, vários métodos são utilizados para que a produção em larga escala ocorra sem muitos prejuízos, entre eles o químico. No controle químico é empregado o uso de herbicidas com a finalidade de inibir o desenvolvimento e/ou provocar a morte das plantas daninhas, entretanto, este método deve ser associado com outras práticas de controle, sendo a de maior importância o controle cultural (SILVA et al., 2002).

Um herbicida pode ser definido como qualquer produto químico que mata ou inibi o desenvolvimento de plantas daninha (LORENZI, 1990). São aplicados em doses convenientes diretamente sobre a vegetação para absorção foliar (tratamento de pós-emergência), ou no solo para absorção por tecidos formados após a germinação da semente antes da emergência da planta na superfície (tratamento de pré-emergência) (BLANCO, 2008). As doses de herbicidas normalmente recomendadas nos rótulos são estabelecidas pelos fabricantes em níveis elevados para assegurar o controle eficiente das espécies sobre uma ampla faixa de condições de manejo e de ambiente (DEVLIN et al., 1991).

Porém a aplicação destes compostos, dependendo do princípio ativo ou da formulação, da dose utilizada, dos microrganismos presentes e da sensibilidade destes aos diversos produtos (ROYUELA et al., 1998), das condições climáticas e do tipo de solo (SILVA et al., 2003), pode trazer consequências indesejáveis.

Além de danos a saúde humana, os herbicidas atuais têm provocado mudanças nas populações de espécies invasoras aumentando a resistência a esses compostos e causando risco de contaminação ambiental (OLOFSDOTTER; MADSEN 2000; DUKE et al. 2000). Os problemas de resistência de plantas daninhas a herbicidas surgiram a partir dos anos 80, com o desenvolvimento e uso repetitivo, por vários anos, de produtos altamente eficientes e seletivos, contribuindo para a seleção de plantas daninhas resistentes aos mesmos (CARVALHO, 2004). Ohmes e Kendig (1999) distinguem dois modos pelos quais pode surgir resistência em uma população: mutação através da

intensidade de seleção recorrente, a qual altera uma população suscetível para uma população resistente, geração após geração; e preexistência de genes na população.

Além de induzir a resistência os herbicidas podem alterar propriedade físico-química da água e do solo. Ahmad e Malloch (1995) relatam redução de até 40% na população bacteriana de um solo, criando um vazio biológico e com isso aumentando a disponibilidade de nutrientes para fitopatógenos habitantes de solo, ocasionando aumento significativo na incidência das doenças.

2.4. O herbicida Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) (Figura 1), herbicida pré e pós-emergente de baixa reatividade e solubilidade, é importante representante do grupo das triazinas. Os herbicidas deste grupo compreendem cerca de 30% da produção mundial de pesticidas (CABRAL et al., 2003). As s-triazinas normalmente apresentam anel heterocíclico com seis membros, cujos átomos de C e N são simetricamente localizados (PACAKOVA; STULIK; JISKRA,1996). A atrazina é um herbicida de contato, absorvido pelas folhas e raízes e age inibindo o fotossistema II da fotossíntese, bloqueando o fluxo de elétrons, levando a produção de oxigênio singlet em excesso, que resulta na destruição de lipídios de clorofila (PRESTON; MALLORY-SMITH, 2001).

É indicada no controle anual de plantas daninhas em grande variedade de culturas, com 500 g L⁻¹ de ingrediente ativo, incluindo as de milho, cana-de-açúcar, sorgo e pinus. Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados em solos e águas subterrâneas após longo tempo de aplicação (COUTINHO, 2006), com seu tempo de vida médio variando de 20 até mais de 100 dias.



Figura 1. Estrutura química atrazina

2.5. Bioherbicidas e alelopatia

A maioria das substâncias alelopáticas provém do metabolismo secundário, porque na evolução das plantas representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (WALLER, 1999).

Diante da crescente preocupação mundial com a preservação e conservação do meio ambiente e com o uso do petróleo, matéria-prima de alguns herbicidas, a proposta de introdução de bioherbicidas como forma de combate a plantas daninhas está crescendo a cada ano. Assim, a alelopatia se configura como uma área de pesquisa de grande importância, por permitir a busca de substâncias de origem vegetal com atributos de bioherbicidas para o controle de plantas invasoras na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente, preservando os recursos naturais e garantindo a oferta de produtos de qualidade (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

Diversas espécies tem potencial para serem utilizadas como bioherbicidas, a exemplo de *Dieffenbachia picta* Schott (Apocynaceae) considerada tóxica por suas folhas possuírem glicosídeos cardiotoxícos denominados oleandrina e neriantina (BARG, 2004), possui atividade alelopática negativa sobre sementes de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* (HOFFMANN et al., 2007). A aveia devido aos ácidos fenólicos, ferúlico, cumáricos, siríngico, vanílico e p-hidroxibenzóico (GUENZI; MCCALLA, 1966; GUENZI; MCCALLA; NORSTADT, 1967) e a escopoletina (FAY; DUKE, 1977) exerce efeito negativo sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas indesejáveis. A cobertura morta de *Leucaena leucocephala* (leucena) apresenta propriedades de controle de plantas daninhas, devido à presença de aleloquímicos na parte aérea da planta (BUDELMAN, 1988). Dentre essas substâncias, o potencial alelopático da leucena é atribuído principalmente ao aleloquímico mimosina.

Sorghum bicolor L. (sorgo), por sua reconhecida ação alelopática, tem sido utilizado em sistemas de cultivo consorciado na tentativa de diminuir o uso de herbicidas químicos (SANTOS et al., 2012). Um de seus compostos, o sorgoleone, atua inibindo a fotossíntese (CZARNOTA et al., 2001; YANG et al., 2004). Tendo atuação também no transporte de elétrons mitocondrial, interferindo na atividade da H⁺-ATPase e ainda na captura de água do solo (HEJL; KOSTER, 2004; DAYAN et al., 2009).

2.6. Descrição botânica e características morfológicas da espécie em estudo

Calotropis procera é uma espécie pertencente à família Apocynaceae (Asclepiadoideae) (Figura 2). Originária da África está amplamente distribuída na Ásia, África e América do Sul sendo abundante no Nordeste brasileiro (RAMOS et al., 2006). Tem se destacado na adaptação a regiões semiáridas e áridas, desenvolvendo-se satisfatoriamente em solos degradados e em locais com baixos índices pluviométricos, permanecendo verde e exuberante durante todo o ano (MELO et al., 2001).

Introduzida no Brasil no século passado com fins ornamentais, tem sido alvo de diversos estudos, principalmente, por apresentar diversas propriedades como a presença de substâncias ativas de uso farmacológico (COSTA et al., 2009).

A família Apocynaceae consta de aproximadamente 355 gêneros e 3700 espécies, estando ampla e predominantemente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, com poucos gêneros ocorrendo em regiões temperadas (JUDD et al., 2009). O gênero *Calotropis* contém cerca de seis espécies de arbustos, sendo que, duas espécies deste gênero, *Calotropis gigantea* e *Calotropis procera*, são de grande importância econômica (PARI et al., 1998).



Figura 2. Aspecto geral de *Calotropis procera* na localidade Guaribas, Crato-CE.

C. procera é conhecida popularmente como algodão de seda, flor-de-seda, leiteiro, queimadeira e ciúme (MELO et al., 2001). De porte arbustivo ou subarbóreo,

ereto e perene com poucas ramificações pode atingir até 3,5 m de altura. Nas plantas jovens ramos, folhas, pedúnculos e frutos são revestidos de cera. Suas folhas simples, sésseis, geralmente opostas, subcoriáceas e de coloração verde-clara, estão mais presentes na parte elevada da planta, sendo que as inferiores se desprendem gradualmente. Possui inflorescências em pedúnculos carnosos e cilíndricos, terminais e axilares com flores roxas, actinomorfas e hermafroditas. Os frutos são folículos inflados, globosos ou mangiformes, com sementes ovóides que no ápice apresenta filamentos sedosos de coloração prateada ou branca (KISSMANN; GROTH, 1999).

A casca corticiforme, sulcada, de coloração cinza, apresenta abundante fluxo de seiva branca (látex), que pode ser observado sempre que o caule e as folhas são cortados (Francis, s.d). Seu sistema radicular é bastante desenvolvido, com raiz principal pivotante profunda e com quase nenhuma raiz lateral próxima à superfície (SHARMA, 1968).

2.7. Atividade biológica de *Calotropis procera*

Apocynaceae apresenta grande importância medicinal devido à presença de diversas classes de metabólitos secundários isolados a partir de folhas e cascas de seus representantes, como glicosídeos cardiotônicos e alcaloides (RIZZINI; MORS, 1976; MOURA; AGRA, 1989).

Diversos estudos sobre a atividade farmacológica de *C. procera* são encontrados na literatura. Em estudos realizados por Rasika et al. (1999); Dewan et al. (2000), o látex de *C. procera* mostrou-se eficiente no processo de cura de feridas devido ao aumento de colágeno, síntese de DNA, de proteínas e epitelização, reduzindo a área do ferimento. Para Kumar e Basu (1994), o látex de *Calotropis procera* também apresenta antiinflamatória, agindo principalmente, em bactérias gram-negativas, como mostra o trabalho de Brito et al. (2010), onde as frações de hexano, acetato de etila, metanol e água, do látex de *C. procera* mostraram-se eficazes contra *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo Sharma et al. (1934), o referido látex pode ser muito irritante e corrosivo, sendo usado com fins criminais por suas propriedades abortiva e infanticida.

As flores de *C. procera* possuem atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas (SMIT et al., 1995); efeito anti-inflamatório em modelo inflamação induzida por carragenina; antipirético e diminuição das contorções abdominais induzidas por ácido acético (MASCOLO et al., 1988), e atividade hepatoprotetora em hepatite causada por paracetamol (RAMACHANDRA et al., 2007).

As raízes desta espécie mostraram uma ação antitumoral (VAN QUAQUEBEKE et al., 2005; MATHUR et al., 2009); atividade anti-inflamatória em modelo de artrite induzida por formaldeído e adjuvante completo de Freud (BASU; CHAUDHURI, 1991; PARIHAR, et al., 2011), e atividade antiulcerosa (SEN; BASU; CHAUDHURI, 1998).

As folhas de *Calotropis procera*, possuem ação anti-inflamatória (ARYA; KUMAR, 2005), analgésica (DEWAN; SAN GRAUKA; KUMAR, 2000), antipirética, bloqueadora neuromuscular, anti-bacteriana (TANIRA et al. 1994), anticolinérgica muscarínica, entre outras. Barros et al. (2004), ao avaliar as atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico obtidos das folhas de *Calotropis procera* em camundongos, constataram que espécie vegetal possui constituintes com ações analgésica periférica e anti-inflamatória.

Oladimeji; Nia; e Essien (2006), os quais trabalharam com extratos das folhas e do caule de *C. procera*, demonstraram a ação antibacteriana da fração acetato de etila de *C. procera* contra bactérias Gram negativas.

Melo et al. (2001) ao estudar a toxicidade da *Calotropis procera* e sua possível utilização na alimentação de ruminantes, realizou estudo fitoquímico das partes aéreas (folhas e galhos) e a administração das mesmas em diferentes concentrações para caprinos e concluiu que a ingestão de folhas de *Calotropis procera* secas e picadas, por caprinos adultos machos, numa concentração de até 60% na alimentação, durante 40 dias consecutivos, não produzem alterações clínicas nem enzimáticas séricas.

O efeito antiparasitário de *Calotropis procera* também é reconhecido, Lázaro et al. (2012), ao avaliar a eficácia *in vitro* de diferentes concentrações de extratos aquosos de algodão de seda sobre a eficiência reprodutiva de *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino) em comparação a um produto comercial sintético, verificou que os extratos nas concentrações de 5, 25 e 100% apresentaram eficiências carrapaticida superiores a 95% e que o produto comercial utilizado como controle positivo apresentou eficácia de 93,9%. Iqbal et al. (2005) observaram redução na contagem de ovos em ovinos infestados por *Haemonchus contortus* com a espécie em estudo. A eficácia do látex de *C. procera* foi demonstrada por Mahmoud et al. (2001) com a redução de oocistos de *Eimeria* sp. em cordeiros.

As folhas e flores de *C. procera* apresentaram boa atividade anti-helmíntica, particularmente contra nematóides quando incorporadas ao solo (AKTHAR et al., 1992; IQBAL et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; MALLOCH, D. Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 54, n. 3, p. 165-174, 1995.
- AKHTAR, N.; MALIK, A.; ALI, S. N.; KAZMI, S. U. Proceragenin, and antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 3, n. 8, p. 2821- 2824, 1992.
- ALMEIDA, A. R. P. A defesa das plantas: alelopatia. **Ciências Hoje**, v. 11, n. 62, p. 38-45, 1990.
- ALMEIDA, F. S. Influencia da cobertura morta na biologia do solo. **A Granja**, São Paulo, v. 4, n. 451, p. 52-67, 1985.
- ALMEIDA, G. D; ZUCOLOTOZ, M; ZETUM, M. C. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomia Medillín**, v. 61, p. 4237-4247, 2008.
- ALVES, C. A. Interações alelopáticas entre plantas daninhas e hortaliças. **Simpósio: Manejo integrado de plantas daninha em hortaliças**, Botucatu, p. 19-43, 1992.
- ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228-232, 2005.
- BARG, D. G. **Plantas tóxicas. Instituto Brasileiro De Estudos Homeopáticos**. 2004. 23p. Monografia (Graduação em Ciências da Saúde)- Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BARROS, F. E.V; SOUSA, M.D G. T; COSTA, J. L; OLEA, R. S. G; FREIRE, S. M. F; NBORGES, A. C. R; BORGES, M. O. R. Avaliação das atividades analgésica e antinflamatória do extrato metanólico de *calotropis procera*, R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n. 9-10, p. 60-64, 2004.
- BASU, A.; CHAUDHURI, A. K. Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **Journal of Ethnofarmacology**, v.31, p.319-324, 1991.
- BLANCO, F.M.G. Manejo das plantas daninhas na cultura de batata. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 19-24, 2008.
- BOGATEK, R; GNIAZDOWSK, A; ZAKRZEWSKA, S. W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination on seedling growth. **Biologia Plantarum**, v. 50, n.1, p. 156-158, 2006.
- BRITO, S. A.; COUTINHO, H. D. M.; BARROS, A. R. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do látex de *Calotropis procera* (Asclepidaceae). **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 31-39, 2010.

BUDELMAN, A. The performance of the leaf mulches of *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* and *Gliricidia sepium* in weed control. **Agroforestry Systems**, v.6, p.137-145, 1988.

CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.)) Rohwer aqueous extracts. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, J. C. **Mecanismo de ação dos herbicidas e sua relação com a resistência a herbicidas**. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Campinas: HRAC-BR, p. 23-48, 2004.

CHOU, C.H.; KUO, Y.L. Allelopathic research of subtropical vegetation in taiwan. III. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.). **Journal Chemical Ecology**, v. 12, p. 1431-1448, 1986.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.500-506, 2011.

COSTA, R. G; MEDEIROS, A. N; ALVES, A. R; MEDEIROS, G. R. Perspectivas de utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Caatinga**, v.22, n.1, p.01-09, 2009.

COUTINHO, C.; TANIMOTO, S.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R.; MAZO, L.; AVACA, L.; MACHADO, S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, n.10, p. 61-72, 2006.

CZARNOTA, M.A.; PAUL, R.N.; DAYAN, F.E.; NIMBAL, C.I.; WESTON, L.A. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology**, v.15, p.813-825, 2001.

DAYAN, F.E.; HOWELL, J.L.; WEIDENHAMER, J.D. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.7, p.2107-2117, 2009.

DEVLIN, D.L.; LONG, J.H.; MADDUX, L.D. Using reduced rates of postemergence herbicides in soybeans (*Glycine max*). **Weed Technology**, v.5, p.834-840, 1991.

DEWAN, S.; SAN GRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesics activity of latex *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1/2, p.307-11, 2000.

DUKE, S.; DAYAN, R.; ROMAGNI, J.; RIMANDO, A. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p.99-111, 2000.

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

FAY, P.K.; DUKE, W.B. An Assessment of Allelopathic Potential in Avena Germplasm. **Weed Science**, v.5, p.224-228, 1977.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. **Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia**. In: VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, DF. Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Brasília, 1999.

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

FRANCIS, J. K. **Wildland shrubs of the United States and its Territories: thamnic descriptions**. Gen. Tech. Rep. IITF-GTR-26. San Juan, PR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, and Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, v.1, 2004, 830 p.

GUENZI, W.D.; MCCALLA, T.M.; NORSTADT, F.A. Presence and Persistence of Phytotoxic Substances in Wheat, Oat, Corn, and Sorghum Residues. **Agronomy Journal**, v.59, p.163-165, 1967.

GUENZI, W.D.; MCCALLA, T.M. Phenolic Acids in Oat, Wheat, Sorghum, and Corn Residues and Their Phytotoxicity. **Agronomy Journal**, v.58 p.303-304, 1966.

HEJL, A.M.; KOSTER, K.L. The allelochemical sorgoleone inhibits root H⁺-ATPase and water uptake. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, n.11, p.2181-2191, 2004.

HOFFMANN, C.E.F.; NEVES, L.A.S.; BASTOS, C.F.; WALLAU, G.L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p. 11-21, 2007.

INDERJIT e DAKSHINI, K. M. M. Allelopathic effect of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on characteristics of four soils and tomato and mustard growth. **American Journal of Botany**, v. 81, p. 799-804, 1994.

INDERJIT.; DAKSHINI, K. M. M. Interference potencial o *Pluchea lanceolata* (Asteraceae): growth and physiological responses of asparagus bean, *Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*. **American Journal of Botany**, v. 79, p. 977-981, 1992.

IQBAL, Z; LATEEF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M. N.; Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 102, n. 2, p. 256-261, 2005.

JUDD, W. S; CAMPBELL, C.S; KELLOGG, E. A; STEVENS, P. F; DONOGHUE, M. **J. Sistemática Vegetal - Um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre, Editora Artemed, 2009, 632p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2.ed. v.2. São Paulo: Editora BASF, p. 978, 1999.

KUMAR, V. L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnofarmacology**, v.44, n. 2, p.123-5, 1994.

LÁZARO, S.F.; FONSECA, L.D.; FERNANDES, R.C.; TOLENTINO, J.S.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R. Efeito do extrato aquoso do algodão de seda (*Calotropis procera* Aiton) sobre a eficiência reprodutiva do carrapato bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.302-305, 2012.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa-SP. 3ª ed. Editora Plantarum, 339 p, 1990.

MACÍAS, F.A. et al. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. **Steroids**, v. 71, p. 603-608, 2006.

MACÍAS, F. A. et al. Review: allelopathy: a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p. 327-348, 2007.

MAHMOUD, O.M. et al. Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfadimidine against experimentally induced *Eimeria ovinoidealisis* infection in Najdi lambs. **Small Ruminant Research**, v.42, n.2, p.135-40, 2001.

MANO, A. R. O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. 102p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MASCOLO, N.; SHARMA, R.; JAIN, S. C.; CAPASSO, F. Ethenopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 22, p.211-221, 1988.

MATHUR, R.; GUPTA, S. K.; MATHUR, S. R.; VELPADIAN, T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. Root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p.343-348, 2009.

MELO, M.M.; VAZ, F.A.; GONÇALVEZ, L.C., SATURNINO, H.M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2001.

MENDONÇA, J. E. Atrazina, um veneno à solta no mundo. **Planeta Sustentável**. Disponível em: <http://planetasustentavel.abril.com.br/blog/planeta-urgente/atrazina-um-veneno-a-solta-no-campo/>. Acesso em 20 jan. 2014.

MOURA, M. D. B. M.; AGRA, M. F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, n.2, p.273-279, 1989.

OHMES, G. A.; KENDIG, J. A. Inheritance of an ALS-cross-resistant common cocklebur (*Xanthium strumarium*) biotype. **Weed Technology**, v. 13, n. 1, p. 100-103, 1999.

OLADIMEJI, H.O.; NIA, R.; ESSIEN, E.E. In vitro anti-microbial and brine-shrimp lethality potential of the leaves and stem of *Calotropis procera* (Ait). **African Journal of Biomedical Research**, v.9, n. 3, p.205-211, 2006.

OLOFSDOTTER, M.; MADSEN, B.E. Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): global implication for weedy rice and weed management. **Annals of Applied Biology**, v. 137, p. 279-295, 2000.

PACAKOVA, V.; STULIK, K.; JISKRA, J. High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. **Journal Chromatography A**, v. 754, n. 1-2, p. 17-31, 1996.

PARI, K.; RAO, P.J, RASTROGI, J.N. A Novel Insect Antifeedant Nonprotein Amino Acid from *Calotropis gigantea*. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 102-104, 1998.

PARIHAR, G.; SHARMA, A.; GHULE, S.; SHARMA, P. DESHMUKH, P. SRIVASTAVA, D. N. Anti-inflammatory effect of *Calotropis procera* root bark extract. **Asian Journal of Pharmacy**. Life Science, v. 1, p.29-44, 2011.

PAULA, C. S; CANTELLI, V. C. D; SILVA, C. B; CAMPOS, R; MIGUEL, O. G; MIGUEL, M. D. Atividade alelopática do extrato e frações das folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista de Ciências Farmacéutica Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 47-52, 2014.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, R. V. **Alelopatia**. In: OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J. Plantas daninhas e seu manejo. Guaíba: Agropecuária, p.99-108, 2001.

PRESTON, C.; MALLORY-SMITH, C.A. Biochemical Mechanisms, Inheritance, and Molecular Genetics of Herbicide Resistance in Weed. In: STEPHEN, B. P.; DALE, L. S. **Herbicide Resistance and World Grain**. Boca Raton: CRC, 2001. p. 34-76.

PUTNAM, A. R. **Allelopathic Chemicals**, C & EM, Special Report, 1983.

RAMACHANDRA, S. S.; AHMED, A. Q.; VISWANATH, A. H. M. S.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; VEEGRAN, A. G. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p.451-454, 2007.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P., de FREITAS, C.D.T., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, N.M.N., DE SOUSA, P.A.S., CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of

Aedes aegypti (Linn.). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 503-510, 2006.

RASIKA, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healingi potencial of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs. **Journal of Ethnofarmacology**, v.68, n.1/3, p.261-6, 1999.

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

RIZVI, S. J. H; HAQUE, H; SINGH, U. K;RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S. J. H; RIZVI, H. (Eds.) **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London: **Chapman & Hall**; 1992. p. 1-10.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. EPU e USP, São Paulo, 1976.

ROYUELA, M. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pesticide Science**, v. 52, p. 372-380, 1998.

SANTOS, I.L.V.L.; SILVA, C.R.C.; SANTOS, S.L.; MAIA, M.M.D. Sorgoleone: benzoquinona lipídica de sorgo com efeitos alelopáticos na agricultura como herbicida. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.1, p.135-144, 2012.

SEN, T.; BASU, A.; CHAUDURI, A. K. Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* involvement of 5-lipoxygenase pathway. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 12, p.82-87, 1998.

SHARMA, G. K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHARMA, B.M. Root systems of some desert plant in Churu in Rajasthan. **Indian Forestes**, v. 94, n.3, p.240-246, 1968.

SHARMA, G.K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SILVA, A. A. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS, módulo 3, 260p. 2003.

SILVA, A. A.; WERLANG, R. C.; FERREIRA, L. R. Controle de plantas daninhas em pastagens. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM**, 2002, Viçosa. Simpósio...Viçosa: UFV, 2002. p. 279 310.

SILVA, J.; EROTSMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, Alcançe, 422p. 2003.

SMIT, H. F.; WOERDENGAG, H. J.; SINGH, R. H.; MEULENBELD, G. L.; LABADIG, R. .; ZWAVIING, J. H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytoatatic activity. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 47, p. 75-84, 1995.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, R. L. Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de cipó-d' alho (Bignoniaceae). **Plantas Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009.

TANIRA, M.O M. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p.201-205, 1994.

TOMAR, V.; AGARWAL, P.K.; AGARWAL, B.L. Toxic iridocyclitis caused by *Calotropis*. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 18, p. 15-6, 1970.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. **Biotemas**, v. 2, n. 23, p. 13-22, 2010.

VAN, Q. E.; SIMON, G.; DEWELLE, A. J.; YAZIDI, M. E.; BRUYNAEEL, F.; TUTI, J.; NACOUUMA, O.; GUISSOU, P.; DECAESTECKER, B. J. C.; KISS, R. F. Identification of a novel cardenolide (200-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance : structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p.849-856, 2005.

VARSHNEY, A.C.; BHOI, K.L. Cloth from bast fibre of the *Calotropis procera* (Aak plant). **Biological wastes**, v.26, n.3, p. 229-232, 1988.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2001.

WALLER, G.R.; FEUG, M.C.; FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press, p.75-98, 1999.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.

YANG, X.; SCHEFFLER, B.E.; LESLIE, A. Weston SOR1, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.406, p.2251-2259, 2004.

3. ARTIGO 1

Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso de folhas de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

Submissão para publicação na *Revista Brasileira de Biocências*

Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso de folhas de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

Maria Elizete Machado Generino^{1*} e Maria Arlene Pessoa da Silva²

Efeito alelopático e citotóxico de *Calotropis procera* sobre *Lactuca sativa*

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil
 2. Professora da Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil
- * jd.elizete@yahoo.com.br

RESUMO: (Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso de folhas de *Calotropis procera* Aiton (Apocynaceae) sobre *Lactuca sativa* L.). Testes alelopáticos têm por finalidade observar a influência de aleloquímicos na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, e uma vez comprovada essa ação e isolado o composto é possível utilizá-lo na produção de bioherbicidas para o combate a plantas daninhas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade alelopática e citotóxica do extrato das folhas de *Calotropis procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*. No bioensaio o Extrato Aquoso Bruto (EBA) (100 %) foi diluído em água destilada a 25, 50 e 75 % de concentração (Tratamentos). Os grupos Controles constaram de água destilada e herbicida (Atrazina). Cada tratamento constou de cinco repetições com 20 sementes de alface cada, totalizando 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em caixas gerbox tendo por substrato duas folhas de papel germitest umedecidos com três mL de cada concentração do EBA e nos grupos Controles água destilada e Atrazina. O experimento foi conduzido em Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas por sete dias em temperatura constante de 25 °C. Os parâmetros analisados foram Porcentagem de Germinação (%), Índice de Velocidade de

Germinação (IVG), desenvolvimento do caulículo e radícula, ocorrência de necrose nas radículas, e Índice Mitótico e ocorrência de alterações cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos ao Teste de Regressão Polinomial. Foi realizada ainda a prospecção fitoquímica qualitativa do extrato bruto aquoso de *C. procera* e análise quantitativa em HPLC. O extrato aquoso bruto de *C. procera* não interferiu no percentual de germinação de sementes de alface, porém estimulou o Índice de Velocidade de Germinação em todas as concentrações testadas, assim como o desenvolvimento do caulículo e o Índice Mitótico em relação aos controles. Já o comprimento das radículas das plântulas de *L. sativa* foi inibido pelo referido extrato a 75% e 100% de concentração. A análise fitoquímica qualitativa mostrou que esta espécie possui taninos e flavonoides, e a quantitativa demonstrou a presença do composto campferol e quercitrina. Os dados obtidos demonstram que o extrato aquoso das folhas de *C. procera* nas diversas concentrações testadas possui efeito alelopático positivo e negativo sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* e que tais efeitos podem ser atribuídos à presença de campferol e quercitrina.

Palavras-chave: Alelopatia. Bioherbicida. Fitoquímica.

ABSTRACT: (Allelopathic and cytotoxic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* Aiton (Apocynaceae) on *Lactuca sativa* L.). Allelopathic tests are designed to observe the influence of allelochemicals on seed germination and seedling development, and once proven this action and isolated the compound is able to use it in production mycoherbicides to combat weeds. The objective of this study was to evaluate the allelopathic and cytotoxic activity of the extract of *Calotropis procera* on seeds and seedlings of *Lactuca sativa*. Gross bioassay aqueous (EBA) (100%) was diluted in distilled water at 25, 50 and 75% concentration (treatment). The groups consisted of

distilled water and herbicide controls (Atrazine). Each treatment had five replicates of 20 lettuce seeds each, totaling 100 seeds per treatment. The experiment was conducted in boxes gerbox having substrate by two germitest moistened sheets of paper with three mL of each concentration of EBA and groups Controls distilled water and Atrazine. The experiment was conducted in germination chamber BOD with photoperiod of 12 hours for seven days in constant temperature of 25 ° C. The parameters analyzed were percentage of germination (%), Germination Speed Index (GSI), development of caulículo and radicle, occurrence of rotted rootlets, and Mitotic Index and the occurrence of chromosomal alterations. Data were submitted to polynomial regression test. Yet it was carried out a qualitative phytochemical screening of the aqueous crude extract of *C. procera* and quantitative analysis in HPLC. The crude aqueous extract of *C. procera* did not affect the percentage of lettuce seed germination, but stimulated the germination speed index in all tested concentrations, as well as the development of caulículo and the Mitotic Index in relation to controls. Since the length of sprouts of seedlings of *L. sativa* extract was inhibited by 75% referred to 100% concentration. Qualitative phytochemical analysis showed that this species has tannins and flavonoids, and demonstrated the quantitative presence of kaempferol and quercitrin compound. The data obtained show that the aqueous extract of the leaves of *C. procera* in different concentrations tested has allelopathic positive and negative effect on seeds and seedlings of *Lactuca sativa* and that this effect can be attributed to the presence of kaempferol and quercitrin.

Keywords: Allelopathy. Bioherbicida. Phytochemical.

INTRODUÇÃO

Os vegetais possuem uma constituição química diversificada, isso porque as substâncias produzidas pelas plantas podem resultar do metabolismo primário ou secundário (Rodrigues; Lopes, 2001), onde os metabólitos primários atuam a nível celular e os metabólitos secundários, principalmente, na sua defesa contra insetos e microrganismos (Souza et al., 2005). Alguns compostos químicos provenientes do metabolismo secundário, também denominados de aleloquímicos, quando liberados podem interferir na germinação ou no crescimento de outra espécie vegetal (Rice, 1984; Chon & Kim, 2004).

São conhecidos cerca de 10 mil produtos fitoquímicos com potencial alelopático pertencentes aos mais variados grupos químicos (Hoffmann *et al.* 2007). Dentre eles estão os ácidos fenólicos, as cumarinas, os terpenoides, flavonoides, alcaloides, glicosídeos cianogênicos (Medeiros 1990). Com isso a descoberta de novos aleloquímicos é uma alternativa ao uso de herbicidas convencionais no controle de plantas invasoras (Oliveira *et al.* 2012).

Calotropis procera (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) é popularmente conhecida no Brasil como “algodão-de-seda”, “algodão-brabo”, “algodão-de-praia”, “leiteiro”, e apresenta uma distribuição geográfica muito ampla, principalmente em regiões semiáridas (Melo *et al.* 2001). Suas folhas possuem látex, com importante ação na defesa contra insetos e microrganismos, o qual segundo teste fitoquímico realizado por Brito *et al.* (2010) apresenta alcaloides em sua constituição. Este composto tem atividade fitotóxica sendo encontrado em todas as partes dos vegetais, porém com o acúmulo preferencialmente em tecidos de crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (Henriques *et al.* 2004).

As folhas de *C. procera* têm sido pesquisadas como alternativa na alimentação de animais. Mahmoud, Adam & Tartour (1979) ao fornecerem as folhas frescas a ovinos observaram perda de apetite, diarreia, dispneia e alopecia, levando quatro animais a óbito dos cinco que receberam as folhas como alimento. Porém, Melo *et al.* (2001) comprovaram que folhas desta espécie, picadas e secas, ingeridas por caprinos machos adultos, numa concentração de até 60 % da alimentação, não apresentou efeitos clínicos, nem enzimáticos, durante um período de 40 dias consecutivos.

As folhas de *C. procera* também são utilizadas com fim medicinal, principalmente como anti-inflamatória (Arya; Kumar, 2005). Na medicina tradicional da Arábia Saudita as partes aéreas da *C. procera* são comumente usadas para o tratamento de várias doenças como febre, dor, espasmo muscular e constipação (Mossa *et al.* 1991).

Considerando à ação fitotóxica e farmacológica de *C. procera* que pode ter relação com a ocorrência de flavonoides, taninos e compostos fenólicos, potenciais aleloquímicos, no presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de folhas de *Calotropis procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

O material botânico foi coletado na cidade de Crato-CE na localidade das Guaribas, nas coordenadas geográficas 7°13'02''S e 39°26'08''W, o mesmo foi levado ao Laboratório de Botânica Aplicada (LBA) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Uma parte deste material foi herborizado e depositado junto ao acervo do

Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) com número de exsicata 2601. O material restante foi utilizado para os bioensaios e na prospecção fitoquímica.

Preparo do extrato aquoso bruto (EBA)

Inicialmente, 100 g de folhas frescas de *C. procera* foram postas para secar em estufa a 70 °C para o estabelecimento da quantidade de água a ser utilizada na produção do extrato a partir da relação entre o peso da matéria seca (PMS) e peso matéria fresca (PMF). Após totalmente secas, as folhas foram pesadas, obtendo assim o PMS de 0,015 g, obtendo-se um índice correspondente ao volume de água destilada em mL a ser adicionada no extrato (Medeiros 1989).

$$V_{H_2O} = \frac{PMF \times 100}{PMS}$$

Para a produção do EBA foram utilizadas 100 g de folhas frescas trituradas em 666,6 mL de água destilada com auxílio de liquidificador industrial. O material triturado foi filtrado em funil de vidro com algodão, e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos obtendo-se o EBA a 100%. A partir desta concentração foram feitas diluições em água destilada a 75, 50 e 25% de concentração (Tratamentos).

Para cada concentração foram feitas análises físico-químicas, medição do pH em pHmetro digital e osmolaridade em osmômetro, onde os valores obtidos em mOsm/kg foram convertidos para pressão osmótica (MPa) através da equação de Larcher (2004):

$$\pi = -W \times 0,00832 \times \text{tabs}$$

Onde:

π = Pressão osmótica em Mpa;

W = Potencial Osmótico em Osm/Kg;

Tab = Temperatura absoluta em graus Kelvin.

Bioensaio de germinação

O experimento constou de quatro tratamentos composto pelo extrato de *C. procera* a 100, 75, 50 e 25% de concentrações (p/v) e dois grupos-controles, o primeiro constando de água destilada e o segundo de Atrazina. O bioensaio foi conduzido em caixas gerbox de 11 x 11 x 3 cm, tendo por substrato duas folhas de papel germitest umedecidos com 3 mL do extrato nas diferentes concentrações. O Delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC). O herbicida usado foi o Atrazina, na formulação comercial SIPTRAN®, com 500 g L⁻¹ de ingrediente ativo, ajustado para a área da superfície da gerbox, sendo aplicados 6,0 µl por gerbox (Silveira *et al.* 2010).

Cada tratamento foi composto por cinco repetições de 20 sementes de *Lactuca sativa* num total de 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em Câmara de Germinação tipo B.O.D com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por sete dias em temperatura constante de 25°C.

Variáveis analisadas

Foram analisadas as seguintes variáveis: Porcentagem de Germinação (%G).

$$G = \frac{N}{A} 100$$

Onde,

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG) segundo metodologia proposta por Fernandes *et al.* (2007).

$$IVG = \sum \left(\frac{ni}{i} \right)$$

Onde,

ni = o número de sementes germinadas no dia;

i = pelo número de dias.

Desenvolvimentos das plântulas - Sete dias após a germinação foram escolhidas aleatoriamente cinco plântulas de cada placa para a medição da radícula e caulículo e observadas à ocorrência de necrose nas radículas.

Índice Mitótico (IM) e presença ou ausência de mutações cromossômicas - Para o Índice Mitótico foi empregada a técnica de esmagamento (Guerra & Sousa 2002), sendo coletadas, no terceiro dia de germinação, 5 radículas de cada placa, fixadas em solução de Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período as radículas foram transferidas para um Becker e lavadas em água destilada por 5 minutos. Em seguida foram imersas em HCl 5M por 20 minutos e lavadas em água destilada para confecção das lâminas.

O Índice Mitótico foi calculado segundo metodologia proposta por Pires *et al.* (2001).

$$IM = \frac{NCM}{NCT} \times 100$$

Onde,

NCM = número de células em mitose;

NCT = número total de células observadas.

Foram analisados e fotografados cinco campos por lâminas. As fotografias foram feitas com auxílio de um microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada no aumento de 1000x.

Análise estatística

Para análise estatística foi aplicado o Teste de Regressão utilizando-se o programa ASSISTAT 7.7 beta (2014).

Prospecção fitoquímica qualitativa

O extrato bruto aquoso das folhas de *C. procera* inicialmente foi liofilizado para posterior análise fitoquímica. Os testes de prospecção foram feitos de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009), o qual se baseia em mudança de cor e formação de precipitado pela adição de reagentes específicos.

Prospecção fitoquímica quantitativa por HPLC

Como a prospecção fitoquímica qualitativa mostrou que o extrato possuía flavonoides, desta classe foi feito o teste quantitativo.

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob as condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro de 5 µm; a fase móvel foi de: (A) acetonitrilo: água (95:5, v/v) e (B) de água: ácido fosfórico (98:2, v/v), e o gradiente de composição foi: 5% de A até 10 min e alterada para se obter 20, 40, 60, 70 e 100% de A a 20, 30, 40, 50 e 60 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Colpo *et al.* (2014). O extrato aquoso das folhas de *Calotropis procera* foi analisado em uma concentração de 10 mg/mL.

A presença dos compostos antioxidantes: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e apigenina foi investigada. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de radiação UV com a dos padrões de referência.

A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, volume de injeção de 40 µL e o comprimento de onda de 270 nm estavam para ácidos gálico e elágico, 280 nm para a catequina, 327 nm para ácidos clorogênicos e cafeico, e 365 nm para a apigenina, luteolina, quercitrina, kaempferol e quercetina. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana 0,45 µm (Millipore), e, em seguida, desgaseificou-se com um banho de ultrassons antes da utilização. As soluções de referência de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,450 mg/mL para catequina, quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e apigenina, e 0,025-0,300 mg/ml para ácido gálico, clorogênico, cafeico e elágico. Os picos da cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 500 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 12627x + 1305,9$ ($r = 0,9998$); catequina: $Y = 11948x + 1178,5$ ($r = 0,9999$); ácido clorogênico: $Y = 12835x + 1169,2$ ($r = 0,9995$); ácido cafeico: $Y = 11876x + 1345,9$ ($r = 0,9997$); ácido elágico: $Y = 13670x + 1243,8$ ($r = 0,9994$); apigenina: $Y = 12834x + 1165,4$ ($r = 0,9996$); luteolina: $Y = 11459x + 1379,1$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 12675x + 1238,7$ ($r = 0,9999$); campferol: $Y = 12705x + 1189,8$ ($r = 0,9995$) e quercetina: $Y = 13652x + 1283,9$ ($r = 0,9998$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicatas. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal como definido por Boligon *et al.* (2013). LOD e LOQ foi calculada como 3,3 e 10 σ/S , respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

As diferenças entre os grupos de HPLC foram avaliadas através de análise de variância e teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi definido como

$p < 0,05$. Estas análises foram realizadas utilizando o software livre R versão 3.1.1. (R CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises físico-químicas, o pH de todas as concentrações teve valores próximos ao ideal para germinação (Tab. 1). Mácias, Gallindo & Molinillo (2000), recomendam que o pH dos extratos aquosos seja ajustado para 6.0, pois esta é a faixa de pH ideal para a germinação de sementes e observação dos efeitos alelopáticos, com um limite máximo de 7,5 (Filho, Rodrigues & Rodrigues 1997, Filho & Dutra 1998, Kerbauy 2004). Segundo Periotto, Perez & Lima (2004), tanto a germinação como o desenvolvimento são afetados negativamente pela acidez ou alcalinidade extremas dos extratos aquosos.

Quanto a osmolaridade, Gatti, Perez & Lima (2004) recomendam que o potencial osmótico de extratos envolvendo testes de germinação não ultrapasse valores - 0,2 MPa, assim, o potencial osmótico do EBA das folhas de *C. procera* em todas as concentrações tiveram valores adequados para o bioensaio (Tab. 1).

Tabela 1: Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA da folha de *Calotropis procera*.

EXTRATO AQUOSO	CONCENTRAÇÕES (%)	pH	OSMOLARIDADE MPa
FOLHA	25	6,58	- 0,02
	50	6,54	- 0,05
	75	6,40	- 0,08
	100	6,03	- 0,11

O extrato aquoso das folhas de *C. procera* não afetou a germinação das sementes de alface, porém estimulou o IVG na concentração de 25% em comparação aos dois controles, e nas demais concentrações comparadas ao herbicida (Fig. 1). Segundo Ferreira & Borguetti (2004), a germinação normalmente é o processo menos afetado pelos aleloquímicos.

Em uma única pesquisa publicada com essa espécie realizada por Fabricante, Oliveira & Filho (2013), foi verificado que concentrações iguais ou superiores a 5% foram suficientes para diminuir o Índice de Velocidade de Germinação de *Lactuca sativa*, adiando o referido processo nas sementes submetidas aos extratos das folhas de *C. procera*.

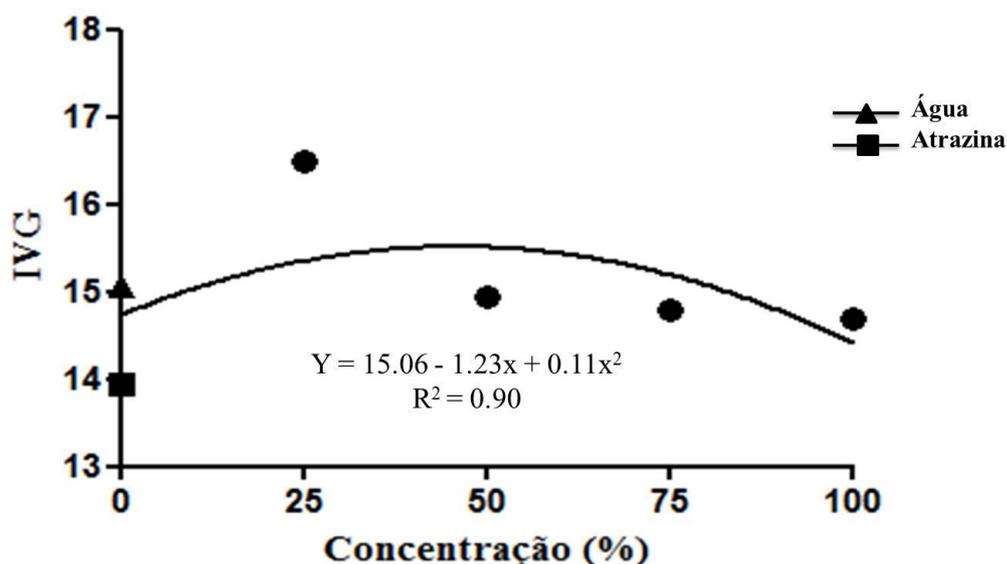


Figura 1. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato das folhas de *Calotropis procera*.

Quanto ao desenvolvimento de *L. sativa*, o Extrato Bruto Aquoso estimulou o crescimento do caulículo das plântulas em todas as concentrações testadas em comparação com os resultados obtidos para os dois controles (Fig. 2). Algumas vezes, a ação alelopática não implica somente em redução, ao contrário, esta ação pode resultar

em estímulo positivo sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta receptora (BITTENCOURT, 2007).

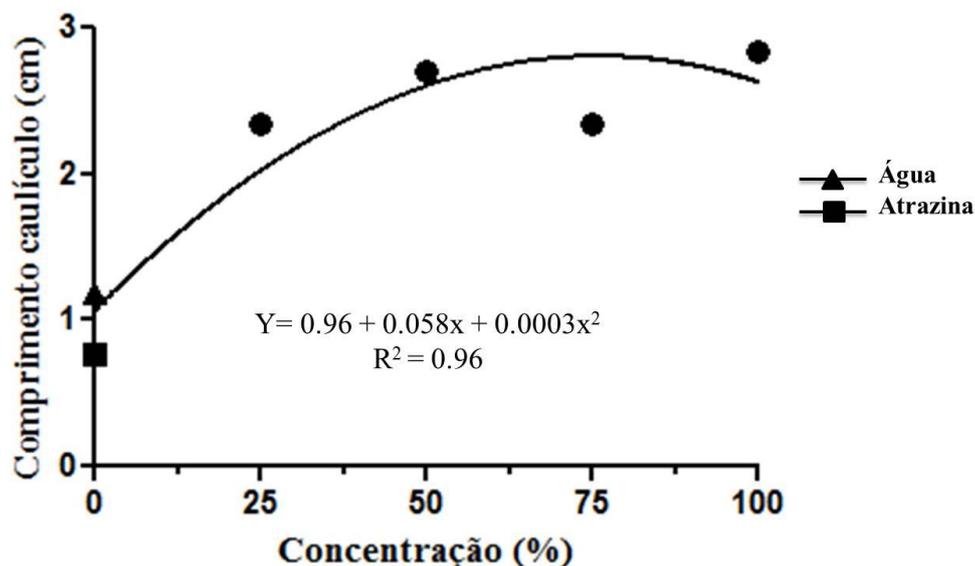


Figura 2. Comprimento dos caulículos de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato das folhas de *Calotropis procera*.

Já o comprimento da radícula foi estimulado a 25%, e inibido a 75 e 100% quando comparados à água e ao herbicida (Fig. 3). Tal efeito pode ter ocorrido pelo maior contato das radículas com o extrato e/ou aumento das concentrações.

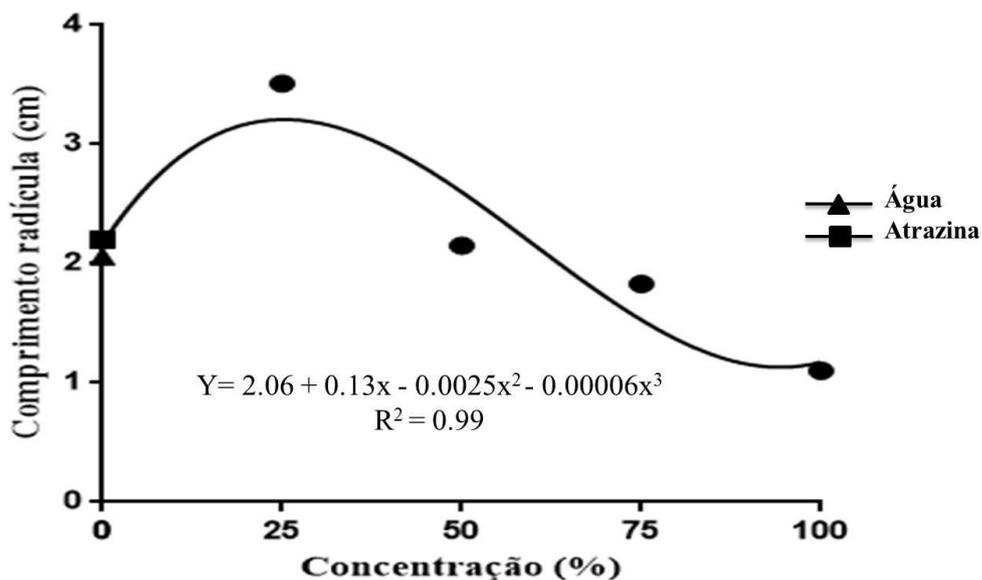


Figura 3. Comprimento das radículas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato das folhas de *Calotropis procera*.

O crescimento inicial das plântulas é a etapa mais afetada nas interações alelopáticas (Borella, Wandscheer & Pastorini 2011). Hoffmann *et al.* (2007), afirmam que o sistema radicular das plantas é o mais sensível a ação de aleloquímicos uma vez que o seu crescimento primário depende das divisões celulares, que, se inibidas, comprometem o desenvolvimento normal.

Al-Zahrani & Al-Robai (2007), mostraram com seus resultados que em baixa concentração do extrato aquoso das folhas de *C. procera* (5%) houve um estímulo no comprimento das radículas de pepino, de feno-grego e de *Senna occidentalis*.

Em relação à necrose radicular, o EBA das folhas de *C. procera* não provocou nenhuma anormalidade nas plântulas de alface.

O Índice Mitótico foi estimulado em todas as concentrações em comparação com os dois controles (Fig. 4), e não foram observadas alterações cromossômicas nas células de radículas submetidas ao extrato.

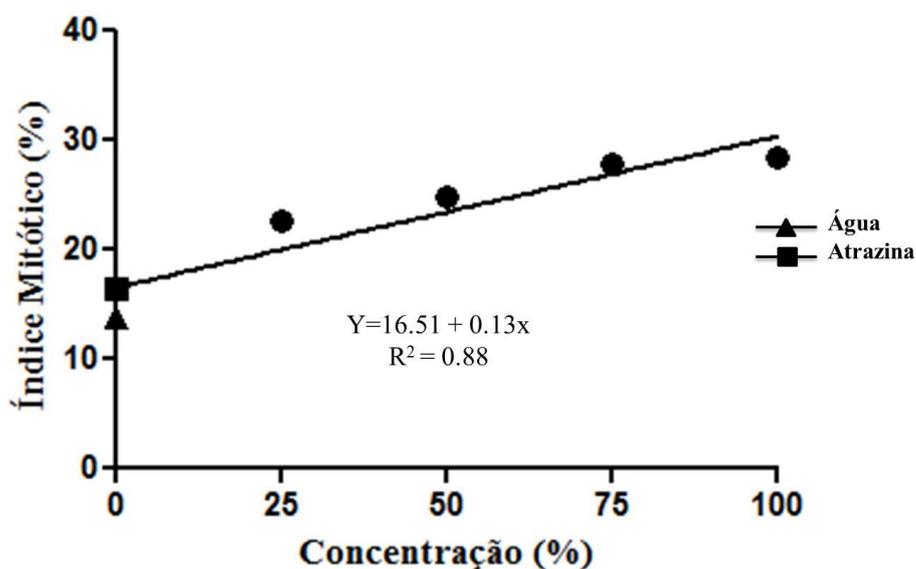


Figura 4. Índice Mitótico de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato das folhas de *Calotropis procera*.

A prospecção fitoquímica qualitativa do extrato aquoso de *C. procera* mostrou possuir algumas classes de compostos secundários, dentre elas os taninos flavafênicos, flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; flavononóis; leucoantocianidinas e catequinas (Tab. 2). O trabalho feito por Dechamps & Oliveira (2011) mostrou que espécies de *C. procera* do semi-árido de Pernambuco não apresentaram alcalóides e taninos, porém possuíam triterpenos, flavonoides e óleos. Porém, o estudo fitoquímico feito por Melo *et al.* (2001), mostrou que as folhas de *C. procera*, coletadas no estado de Minas Gerais, possuía glicosídeos flavônicos, glicosídeos cardiotônicos, triterpenos, esteróides e polifenóis. Brito *et al.* (2010), mostra a presença de alcaloides em frações do látex.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do EBA da folha de *Calotropis procera*

Pesquisa	EBA de <i>C. procera</i>
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos flavafênicos	+
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	+
Chalconas e auronas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	+
Catequinas	+
Flavononas	-
Alcalóides	-

(+) presente (-) ausente

Provavelmente a interação entre taninos, ácido gálico e proteínas são as bases para propriedades farmacológicas e alelopáticas (Rangari 2009). As saponinas, taninos e os compostos fenólicos estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos sobre a germinação e morfologia (Rice 1984, Ferreira & Áquila 2000).

Os flavonoides apresentam variadas atividades biológicas como ação anti-inflamatória, antialérgica e antitumoral assim como atividades antibacteriana e

antifúngica (Rice-Evans & Packer 1998). Além destas ações e dos efeitos conhecidos de atividade antioxidante, os flavonoides estimulam a comunicação entre membranas, regulação do crescimento celular, indução de enzimas de detoxificação, inibição da germinação e crescimento de plântulas (Macias *et al.* 1997, Yang, Lamprecht & Liu 2000, Hoagland & Williams 2004). Estudos sugerem que estes compostos também funcionam no desenvolvimento vegetal, como reguladores do transporte polar das auxinas (Taiz & Zeiger 2004). Flavonoides como campferol podem proteger as plantas contra a radiação ultravioleta sendo também responsável pelas características de cor, qualidade e resistência da madeira na formação do cerne de troncos lenhosos (Tavares, Reinert & Valentin 2010).

A análise quantitativa por HPLC do extrato aquoso das folhas de *C. procera* revelou a presença de ácido gálico (tR = 10,87 min; pico 1), catequina (tR = 16,05 min, pico 2), ácido clorogénico (tR = 22,13 min; pico 3), ácido caféico (tR = 27,48 min; pico 4), ácido elágico (tR = 34,01 min; pico 5), quercitrina (tR = 44,97 min; pico 6), quercetina (tR = 47,56 min; pico 7), campferol (tR = 53,29 min; pico 8), luteolina (tR = 58,73 min; pico 9) e apigenina (tR = 65,81 min; pico 10) (Fig. 5 e Tab. 3).

O nível do composto campferol foi muito significativo no extrato das folhas de *Calotropis procera*, seguido do composto quercitrina.

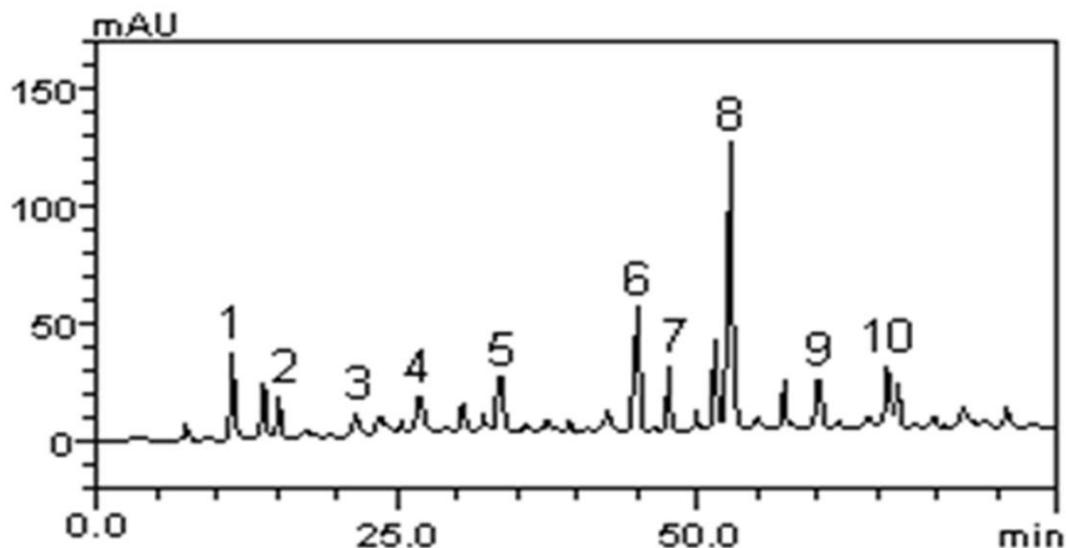


Figura 5. Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de folhas de *Calotropis procera*. O ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico de 8), luteolina (pico de 9) e apigenina (pico 10).

Tabela 3. Composição química do extrato aquoso das folhas de *Calotropis procera*.

Compostos		LOD	LOQ
	(mg/g)	µg/mL	µg/mL
ácido gálico	4.37 ± 0.01 a	0.015	0.053
Catequina	1.82 ± 0.01 b	0.026	0.084
Ácido clorogênico	0.64 ± 0.03 c	0.009	0.031
Ácido caféico	1.79 ± 0.01 b	0.018	0.059
Ácido elágico	2.65 ± 0.02 d	0.013	0.049
Quercitrina	6.13 ± 0.03 e	0.036	0.119
Quercetina	3.28 ± 0.01 f	0.010	0.034
Campferol	14.05 ± 0.03 g	0.025	0.079
Luteolina	2.59 ± 0.02 d	0.007	0.023
Apigenina	2.71 ± 0.01 d	0.014	0.045

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão (DP) de três determinações médias. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

A quercitrina, um dos compostos majoritários encontrados no extrato aquoso na presente pesquisa já foi relatado por diversos autores como responsável pelo efeito alelopático observado em suas pesquisas a exemplo de estudos realizados por Malheiros

(2001) com o extrato clorofórmico e metanólico das folhas de *Drimys angustifolia* Miers, no qual foi encontrado o composto quercitrina os quais revelaram um aumento no comprimento da radícula de plântulas de alface a partir de 750 ppm, e um aumento no comprimento do hipocótilo nas concentrações de 750 e 1500 ppm do extrato clorofórmico. Já o extrato da clorofórmico casca dessa mesma espécie provocou uma diminuição no comprimento do hipocótilo nas concentrações a partir de 750 ppm. Malheiros *et al.* (2014) também verificou uma inibição no crescimento de radículas de alface submetidas ao extrato etanólico do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., na concentração de 1000 mg L^{-1} quando comparada ao controle. Porém, esse mesmo extrato em todas as concentrações testadas promoveu um aumento significativo no comprimento do hipocótilo quando comparado ao controle. Vale ressaltar que o referido extrato também apresentou campferol em sua composição, corroborando com nossos resultados.

Peres *et al.* (2000), testando o composto campferol, extraído de frações de frondes jovens e verdes de *Gleichenia pectinata* Willd, em sementes de alface verificaram que o campferol não exerceu influência sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*.

CONCLUSÃO

- O extrato aquoso das folhas de *Calotropis procera* interferiu de modo positivo sobre o Índice de Velocidade de Germinação, comprimento do caulículo e Índice Mitótico em todas as concentrações testadas, e no desenvolvimento da radícula a 25%;

- A análise de HPLC mostrou que o referido extrato apresenta os seguintes flavonoides: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, quercitrina, campferol, luteonina e apigenina.
- A ação alelopática observada pode ser atribuída à ocorrência dos referidos flavonoides, já que os mesmos tem influência no desenvolvimento dos vegetais. Entretanto estudos mais detalhados devem ser realizados com estes compostos, como seu uso no controle de plantas daninhas, para uma possível confirmação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

AL-ZAHRANI H. S. & AL-ROBAI, S. A. 2007. Allelopathic Effect of *Calotropis procera* Leaves Extract on Seed Germination of Some Plants. *JKAU: Science*, 10: 115-126.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against diferente mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228-232, 2005. < [http:// 10.1155/MI.2005.228](http://10.1155/MI.2005.228)>

BOLIGON, A. A., KUBICA, T. F., MARIO, D. N., DE BRUM, T. F., PIANA, M., WEIBLEN, R., LOVATO, L., ALVES, S. H., SANTOS, R. C. V., ALVES, C. F. S. &

ATHAYDE, M. L. 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 2229-2239. <<http://10.1007/s11738-013-1259-0>>

BRITO, S. A.; COUTINHO, H. D. M.; BARROS, A. R. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do látex de *Calotropis procera* (Asclepidaceae). **Cadernos de Cultura e Ciências**, v. 2, n. 2, p.31-39, 2010.

BITTENCOURT, H. V. *Ecologia fitoquímica: entendendo e manejando a competição entre vegetais em sistemas de plantas cultivadas*. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, 2007.

BORELLA, J., WANDSCHEER, A. C. D. & PASTORINI, L. H. 2011. Potencial alelopático de extratos aquosos de frutos de *Solanum americanum* Mill. sobre as sementes de rabanete. *Revista de Ciências Agrárias*, 6(2): 309-313. <<http://10.5039/agraria.v6i2a1246>>

BRITO, S. A., COUTINHO, H. D. M., BARROS, A. R. C.; RODRIGUES, F. F. G. & COSTA, J. G. M. 2010. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do látex de *Calotropis procera* (Asclepidaceae). *Caderno de Cultura e Ciência*, 2(2): 31-39.

CHON, S. U.; KIM, Y. M. Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. *Journal Agronomy & Crop Science*, v. 190, p. 145-150, 2004.

COLPO, E., VILANOVA, C. D. D. A., REETZ, L. G. B., DUARTE, M. M. M. F., FARIAS, I. L. G., MEINERZ, D. F., MARIANO, D. O. C., VENDRUSCULO, R. G., BOLIGON, A. A., CORTE, C. L. D., WAGNER, R., ATHAYDE, M. L. & ROCHA, J. B. T. 2014. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, 30: 459-465. <[http:// 10.1016/j.nut.2013.10.005](http://10.1016/j.nut.2013.10.005)>

DECHAMPS, T. A. G. & OLIVEIRA, A. F. M. de. 2001. Morfologia e fitoquímica comparativa de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton. (Apocynaceae) ocorrentes no semiárido e zona da mata do estado de Pernambuco. In: XIX CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., 2001, Pernambuco. *Resumos...* Recife: Centro de Tecnologia e Geociência, UFPE, 2011. 4p.

FABRICANTE, J. R., OLIVEIRA, M. N. A. de. & FILHO, J. A. de S. 2011. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. *Rodriguésia*, 64(3): 647-654. <<http://dx.doi.org/10.1590/S2175-78602013000300015>>

FERNANDES, L. de A. V., MIRANDA, D. L. C. de & SANQUETTA, C. R. 2007. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. *Revista Acadêmica*, 5(2): 139-146. <[http:// academia.pucpr:article/1704](http://academia.pucpr:article/1704)>

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

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

FILHO, A. P. S. & DUTRA, S. 1998. Germinação de sementes de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*). 1998. *Pasturas Tropicales*, 20(3): 26-30.

FILHO, A. P. S., RODRIGUES, A. L. R. A. & RODRIGUES, T. J. D. 1997. Efeito do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32(2): 165-170. <<http://10.1590/S0100-83581997000100007>>

GATTI, A. B., PEREZ, S. C. J. G. A. & LIMA, M. I. S. 2004. Atividade alelopática dos extratos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 459-472.

GUERRA, M. & SOUZA, M. J. 2002. *Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana*. São Paulo: Funpec, 131p.

HENRIQUES, A. T., KERBER, V. A., LIMBERGER, R. P. & MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O., SCHERENKEL,

E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2004. 5 ed. Florianópolis: UFSC.

HOAGLAND, R. E. & WILLIAMS, R. D. Bioassays-useful tools of the study of allelopathy. In: MACIAS, F. A. et al. (Eds.) *Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals*. Florida: CRC Press. 2004. p. 315-41.

HOFFMANN, C. E. F., NEVES, L. A. S., BASTOS, C. F. & WALLAU, G. L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 6(1): 11-21.

KERBAUY, G. B. 2004. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 472 p.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against diferente mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228-232, 2005.

LARCHER, W. 2004. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima Artes e Textos. 531p.

MACÍAS, F. A., GALLINDO, J. C. G. & MOLINILLO, J. M. G. 2000. Plant biocommunicators: application of allelopathic studies. In: *2000 years of natural products research - past, present and future*. (J.C. Lujendijk, ed.). Leiden: Phytoconsult, p.137-161. 2000.

MACÍAS, F. A., MOLINILLO, J. M. G., TORRES, A., VARELA, R. M. & CASTELLANO, D. 1997. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, 45(4): 683–687. <[http:// 10.1016/S0031-9422\(97\)00011-3](http://10.1016/S0031-9422(97)00011-3)>

MAHMOUD, O. M., ADAM, S. E. I. & TARTOUR, G. 1979. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants part 1 effects of feeding sheep with the plant. *Journal of Comparative Pathology*, 89: 241-50.

MALHEIROS, A. 2001. *Estudos químicos, farmacológicos e alelopáticos das espécies Drimys angustifolia e Drimys brasiliensis (Winteraceae)*. 175 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MALHEIROS, R. S. P., SANTANA, F. S., NETO, M. V. L., MACHADO, L. L. & MAPELI, A. M. 2014. Atividade alelopática de extratos de *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. sobre *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L. em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 9(1): 185-194.

MATOS, F. J. A. 2009. *Introdução à fitoquímica experimental*. Forteleza. 3 ed. Edições UFC. 150p.

MEDEIROS, A. R. M. 1989. *Determinação de potencialidades alelopáticas em agroecossistemas*. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

MEDEIROS, A. R. M. 1990. Alelopatia: importância e suas aplicações. *Revista HortiSul*, 1(3): 27-32.

MELO, M. M., VAZ, F. A., GONÇALVES, L. C. & SATURNINO, H. M. 2001. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. , sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2(1): 15-20.

MOSSA, J. S., TARIG, M., MOHSIN, A., AGEEL, A. M., AL-YAHYA, M. A., AL-SAID, M. S. & RAFATULLAH, S. 1991. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American Journal of Chinese Medicine*, 19(3-4): 223-231. <<http://10.1142/S0192415X91000302>>

OLIVEIRA, S. C. C., GUALTIERI, S. C. J., DOMINGUEZ, F. A. M., MOLINILLO, J. M. G. & MONTOYA, R. V. 2012. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. *Acta Botanica Brasilica*, 26(3): 607-618. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062012000300010>>

PERES, M. T. L. P., HESS, S. C. H., PIZZOLLATTI, M. G., QUEIROZ, M. H., MONACHE, F. D. & YUNES, R. A. 2000. Potencial alelopático da fração n-butanólica e flavonóides isolados de *Gleichenia pectinata* WILD (P.R.) sobre sementes de *Lactuca sativa* var. grandrapids. *Sociedade Brasileira de Química*, São Paulo, 30 set. 2014. Disponível em:<<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1481/index.html>>. Acesso em: 30 set. 2014.

PERIOTTO, F., PEREZ, S. C. J. G. de A. & LIMA, M. I. S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasílica*, 18(3):425-430.

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000300003>>

PIRES, N. M., SOUZA, I. R. P., PRATES, H. T., FARIA, T. C. L., FILHO, I. A. P. & MAGALHÃES, P. C. 2001. Efeito do extrato aquoso de *leucena* sobre o desenvolvimento, índice mitótico, e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(1): 55-65. <<http://10.1590/S0103-31312001000100007>>

PUTNAM, A. R. 1988. Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed Technology*, 2: 510-518.

RANGARI, V. D. 2009. *Pharmacognosy & Phytochemistry*. Índia: Career Publications. 350 p.

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

RICE – EVANS, C. A. & PACKER, L. 1998. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker. p. 447-467.

RODRIGUES, F.C.M.P.; LOPES, B.M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**. v.8, n.1, p.130-136, 2001.

SILVEIRA, H. R. O., FERRAZ, E. O., MATOS, C. C., ALVARENGA, I. C. A.,
GUILHERME, D. O., TUFFI SANTOS, L. D. & MARTINS, E. R. 2010. Alelopatia e
homeopatia no manejo da tiririca (*Cyperus rotundus*). *Planta Daninha*, 28(3): 499-506.
<[http:// 10.1590/S0100-83582010000300006](http://10.1590/S0100-83582010000300006)>

SOUZA, S. A. M.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; PIANA, C. F. B.;
BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Atividade alelopática e citotóxica do extrato
aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.). **Ciência, Biologia e
Saúde**, v. 11, n. 3/4, p. 7-14, 2005.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ,
L. A. & PETROVICK, P. R. 2004. *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*, 5 ed.
Editora da UFSC: Santa Catarina.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 722p.

TAVARES, E. S., REINERT, F. & VALENTIN, Y. Y. 2010. *O Incrível Poder dos
Seres Clorofilados*. Volume único. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, p.104.

4. ARTIGO 2

Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso do caule de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

Submissão para publicação na *Semina: ciências agrárias*

Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso do caule de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

Allelopathic and cytotoxic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* stem (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) on seeds and seedlings of *Lactuca sativa* L.

Maria Elizete Machado Generino¹; Maria Arlene Pessoa da Silva²

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil

2. Professora da Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil

RESUMO

A alelopatia tem importância ecológica e econômica, pois através da observação da ação desse fenômeno em espécies vegetais é possível verificar a ocorrência de compostos secundários que substituam herbicidas sintéticos no combate a plantas daninhas propiciando uma desaceleração no uso indiscriminado de agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade alelopática e citotóxica do extrato do caule de *Calotropis procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*, assim como identificar a composição química do extrato aquoso do caule nas diversas concentrações. No bioensaio o Extrato Bruto Aquoso (EBA) a 100 % foi diluído em água destilada a 25, 50 e 75 % de concentração (Tratamentos). Os grupos Controles constaram de água destilada e herbicida (Atrazina). Cada tratamento constou de cinco repetições com 20 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em caixas gerbox tendo por substrato duas folhas de papel germitest umedecidos com três mL de cada concentração do EBA e nos grupos Controles água destilada e Atrazina. O experimento foi conduzido em Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas por sete dias em temperatura constante de 25°C. Os parâmetros analisados foram Porcentagem de Germinação (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), desenvolvimento do caulículo e radícula, ocorrência de necrose nas radículas, e Índice Mitótico e ocorrência de alterações cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos ao Teste de Regressão Polinomial. Foi realizada ainda a prospecção fitoquímica qualitativa do extrato bruto aquoso de *C. procera* e análise quantitativa em HPLC. O EBA do caule de *C. procera* não afetou a germinação de sementes de *Lactuca sativa*, porém o IVG foi inibido nas concentrações de 50%, 75% e 100%. O desenvolvimento do caulículo foi estimulado em todas as concentrações, entretanto, o comprimento da radícula foi inibido a 50%, 75% e 100%. O Índice Mitótico foi estimulado em todas as concentrações. A análise fitoquímica qualitativa mostrou que esta espécie possui flavonoides, e a quantitativa que a espécie possui quercitina, ácido caféico e quercitrina. Os dados obtidos demonstram que o extrato aquoso do caule de *C. procera* nas diversas concentrações testadas possui efeito alelopático sobre sementes de *Lactuca sativa* e que tais efeitos podem ser pela presença de quercitina, ácido caféico e quercitrina.

Palavras-chave: Alelopatia. Citogenética. Fitoquímica

ABSTRACT

Allelopathy has ecological and economic importance, because through the action of observation of this phenomenon in plant species is possible to verify the occurrence of secondary compounds that replace synthetic herbicides to combat weeds providing a slowdown in indiscriminate use of pesticides. The objective of this study was to evaluate the allelopathic and cytotoxic activity of *Calotropis procera* stem extract of seeds and seedlings of *Lactuca sativa*, and identify the chemical composition of the aqueous extract of the stem in all concentrations. In the bioassay Aqueous crude extract (EBA) at 100% was diluted in distilled water at 25, 50 and 75% concentration (treatment). The groups consisted of distilled water and herbicide controls (Atrazine). Each treatment had five replicates of 20 seeds each, totaling 100 seeds per treatment. The experiment was conducted in boxes gerbox having substrate by two germitest moistened sheets of paper with three mL of each concentration of EBA and groups Controls distilled water and Atrazine. The experiment was conducted in germination chamber BOD with photoperiod of 12 hours for seven days in constant temperature of 25 ° C. The parameters analyzed were percentage of germination (%), Germination Speed Index (GSI), development of caulículo and radicle, occurrence of rotted rootlets, and Mitotic Index and the occurrence of chromosomal alterations. Data were submitted to polynomial regression test. Yet it was carried out a qualitative phytochemical screening of the aqueous crude extract of *C. procera* and quantitative analysis in HPLC. EBA *C. procera* stem did not affect the germination of seeds *Lactuca sativa*, but IVG was inhibited at concentrations of 50%, 75% and 100%. The development of caulículo was stimulated at all concentrations, however, the radicle length was inhibited 50%, 75% and 100%. The Mitotic Index was stimulated at all concentrations. The qualitative phytochemical analysis showed that this species has flavonoids, and quantitative that this species has quercetin, caffeic acid and quercitrin. The data obtained show that the aqueous extract of *C. procera* stem in different concentrations tested has allelopathic effect on *Lactuca sativa* seeds and that this effect may be due to the presence of quercetin, caffeic acid and quercitrin.

Keywords: Allelopathy. Cytogenetics. Phytochemistry

INTRODUÇÃO

Diversos produtos do metabolismo secundário de uma determinada planta ao serem liberados no ambiente, podem atuar estimulando ou inibindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas (LORENZI, 2000). Nas últimas décadas o conceito ecológico de preservação vem sendo visto com mais intensidade, tanto pelos latifundiários quanto pelos consumidores, principalmente os adeptos de alimentos orgânicos. Dentro deste contexto os testes allopáticos vêm sendo de fundamental importância, pois uma vez comprovada a ação alelopática de determinada espécie e isolado o composto responsável por essa ação, é possível a utilização do mesmo como um bioherbicida.

Os produtos do metabolismo secundário (aleloquímicos) podem representar uma opção natural no controle de ervas daninhas na agricultura, uma vez que podem ser utilizados como substâncias de controle biológico, permitindo reduzir ou eliminar a contaminação do ambiente,

preservando os recursos naturais e garantindo a produção de produtos agrícolas de alta qualidade, desprovidos de resíduos de agentes contaminantes (SOUZA FILHO et al., 2006; CÂNDIDO et al, 2010).

Nas últimas décadas centenas de espécies vegetais exóticas tem sido introduzida no território brasileiro, contudo, poucos são os estudos voltados para a ação alelopática das mesmas sobre a germinação e o desenvolvimento de espécies nativas dos diversos ambientes.

Calotropis procera (Apocynaceae) conhecida popularmente por algodão seda, flor-de-seda, algodão praia, leiteira, paina-de-sapo, paina-de-seda, saco-de-velho, queimadeira, pé-de-balão, janaúba e ciúme (SOUTO et al., 2008) é originária da África e amplamente distribuída no Brasil onde passou a se comportar como invasora, principalmente em áreas de Cerrado e Caatinga, devido à disseminação de suas sementes pelo vento (CORRÊA, 1939).

Esta espécie possui caule corticiforme que parece ser uma grande adaptação morfofisiológica para reduzir a perda de água excessiva para o meio, funcionando também como isolante térmico e ação direta dos ventos, apresenta fissuras ou sulcos que pode permitir a troca controlada com o meio, além de caule seroso que reduz o ataque de insetos (COSTA et al., 2009)

Pesquisa realizada por Lázaro et al. (2012) mostra a ação fitoterápica de *C. procera* com efeitos analgésicos, antiinflamatórios, agentes purgativos, anti-helmínticos, antimicrobianos, larvicidas, anticancerígenos, e em tratamentos de úlceras gástricas e doenças hepáticas. Segundo Sharma (1934) o látex de *C. procera* atua sobre o coração dos mamíferos, aumentando a força das contrações sistêmicas e causando um aumento na amplitude de contração e relaxamento dos átrios. Porém, Mahmoud et al. (1979), relatam que a toxicidade das folhas frescas e do látex da raferida espécie provoca severa enterohepatopatia em ovelhas e cabras.

Considerando os aspectos acima referidos, no presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito alelopático e citotóxico do extrato do caule de *C. procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*, assim como identificar a composição química do extrato aquoso do caule nas diversas concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

O material botânico foi coletado na cidade de Crato-CE na localidade das Guaribas, nas coordenadas geográficas 7°13'02''S e 39°26'08''W, o mesmo foi levado ao Laboratório de Botânica Aplicada da Universidade Regional do Cariri. Uma parte deste material foi herborizado e depositado junto ao acervo do Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima com

número de exsicata 2601. O material restante foi utilizado para os bioensaios e na prospecção fitoquímica.

Preparo do extrato aquoso bruto (EBA)

Inicialmente, 100 g de folhas frescas de *C. procerca* foram postas para secar em estufa a 70 °C, para estabelecimento da quantidade de água a ser utilizada na produção do extrato a partir da relação entre o peso da matéria seca (PMS) e peso matéria fresca (PMF). Após totalmente secas, as folhas foram pesadas, obtendo assim o PMS de 0,015 g, obtendo-se um índice correspondente ao volume de água destilada em mL a ser adicionada no extrato (MEDEIROS, 1989).

$$V_{H_2O} = \frac{PMF}{PMS} \times 100$$

Para a produção do EBA foram utilizadas 100 g de caule frescos triturados em 285,7 mL de água destilada com auxílio de liquidificador industrial. O material triturado foi filtrado em funil de vidro com algodão, e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos obtendo-se o EBA a 100%. A partir desta concentração foram feitas diluições em água destilada a 75%, 50% e 25% de concentração (Tratamentos).

Para cada concentração foram feitas análises físico-químicas, medição do pH em pHmetro e osmolaridade em osmômetro, onde os valores obtidos em mOsm kg⁻¹ foram convertidos para pressão osmótica (MPa) através da equação de Larcher (2004):

$$\pi = -W \times 0,00832 \times \text{tabs}$$

Onde:

π = Pressão osmótica em Mpa;

W = Potencial Osmótico em Osm/Kg;

Tab = Temperatura absoluta em graus Kelvin.

Bioensaio de germinação

O experimento constou de quatro tratamentos composto pelo extrato de *C. procerca* a 100, 75, 50 e 25% de concentração (p/v) e dois grupos Controles, o primeiro constando de água destilada e o segundo de Atrazina. O bioensaio foi conduzido em caixas gerbox de 11 x 11 x 3 cm, tendo por substrato duas folhas de papel germitest umedecidos com três mL do extrato nas diferentes concentrações. O Delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC). O herbicida usado foi o Atrazina, na formulação comercial SIPTRAN®, com 500 g L⁻¹ de

ingrediente ativo, ajustado para a área da superfície da gerbox, sendo aplicados 6,0 µl por gerbox (SILVEIRA et al., 2010).

Cada tratamento foi composto por cinco repetições de 20 sementes de *Lactuca sativa* num total de 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por sete dias em temperatura constante de 25°C.

Variáveis analisadas

Foram analisadas as seguintes variáveis: Porcentagem de Germinação (%G).

$$G = \frac{N}{A} \cdot 100$$

Onde,

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar

Índice de Velocidade de Germinação (IVG) segundo metodologia proposta por Fernandes; Miranda; Sanquetta, (2007).

$$IVG = \sum \left(\frac{ni}{i} \right)$$

Onde,

ni = o número de sementes germinadas no dia;

i = pelo número de dias

Desenvolvimentos das plântulas- Sete dias após a germinação foram escolhidas aleatoriamente cinco plântulas de cada placa para a medição da radícula e caulículo e observadas à ocorrência de necrose nas radículas.

Índice Mitótico (IM) e presença ou ausência de mutações cromossômicas- Para o Índice Mitótico foi empregada a técnica de esmagamento (GUERRA; SOUSA, 2002), sendo coletadas, no terceiro dia de germinação, 5 radículas de cada placa, fixadas em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período as radículas foram transferidas para um Becker e lavadas em água destilada por 5 minutos. Em seguida foram imersas em HCl 5M por 20 minutos e lavadas em água destilada para confecção das lâminas.

O Índice Mitótico foi calculado segundo metodologia proposta por Pires et al. (2001).

$$IM = \frac{NCM}{NTC} \times 100$$

Onde,

NCM = número de células em mitose

NCT = número total de células observadas

As lâminas contendo células com ocorrência de alterações cromossômicas foram fotografadas com câmera acoplada a microscópio óptico no aumento de 1000x.

Análise estatística

Para análise estatística dos dados obtidos foi aplicado o Teste de Regressão Polinomial utilizando-se o programa ASSISTAT 7.7 beta (2014).

Prospecção Fitoquímica Qualitativa

O extrato bruto aquoso do caule de *C. procera*, inicialmente foi liofilizado para posterior análise fitoquímica. Os testes de prospecção foram feitos de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009), o qual se baseia em mudança de cor e formação de precipitado pela adição de reagentes específicos.

Prospecção Fitoquímica Quantitativa por HPLC

Como a prospecção fitoquímica qualitativa mostrou que o extrato possuía flavonoides, desta classe foi feito o teste quantitativo.

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob as condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro de 5 μm ; a fase móvel foi de: (A) acetonitrilo: água (95:5, v/v) e (B) de água: ácido fosfórico (98:2, v/v), e o gradiente de composição foi: 5% de A até 10 min e alterada para se obter 20%, 40%, 60%, 70% e 100% de A a 20, 30, 40, 50 e 60 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Colpo et al. (2014) com ligeiras modificações. O extrato aquoso do caule de *Calotropis procera* foi analisado em uma concentração de 10 mg mL⁻¹.

A presença dos compostos antioxidantes: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e apigenina foi investigada. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de radiação UV com a dos padrões de referência.

A taxa de fluxo foi de 0,6 mL min⁻¹, volume de injeção de 40 μL e o comprimento de onda de 270 nm estavam para ácidos gálico e elágico, 280 nm para a catequina, a 327 nm para

ácidos clorogênicos e caféico, e 365 nm para a apigenina, luteolina, quercitrina, campferol e quercetina. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana 0,45 µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se com um banho de ultrassons antes da utilização. As soluções de referência de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,450 mg mL⁻¹ para a catequina, a quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e apigenina, e 0,025-0,300 mg mL⁻¹ para gálico, clorogênico, cafeico e ácidos elágico. Os picos da cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 500 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 12627x + 1305,9$ ($r = 0,9998$); catequina: $Y = 11948x + 1178,5$ ($r = 0,9999$); ácido clorogênico: $Y = 12835x + 1169,2$ ($r = 0,9995$); ácido cafeico: $Y = 11876x + 1345,9$ ($r = 0,9997$); ácido elágico: $Y = 13670x + 1243,8$ ($r = 0,9994$); apigenina: $Y = 12834x + 1165,4$ ($r = 0,9996$); luteolina: $Y = 11459x + 1379,1$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 12675x + 1238,7$ ($r = 0,9999$); campferol: $Y = 12705x + 1189,8$ ($r = 0,9995$) e quercetina: $Y = 13652x + 1283,9$ ($r = 0,9998$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicatas. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal como definido por Boligon et al. (2013). LOD e LOQ foi calculado como 3,3 e 10 σ/S , respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

As diferenças entre os grupos de HPLC foram avaliadas através de análise de variância e teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi definido como $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas utilizando o software livre R versão 3.1.1. (R CORE TEAM, 2014).

RESULTADO E DISCUSSÃO

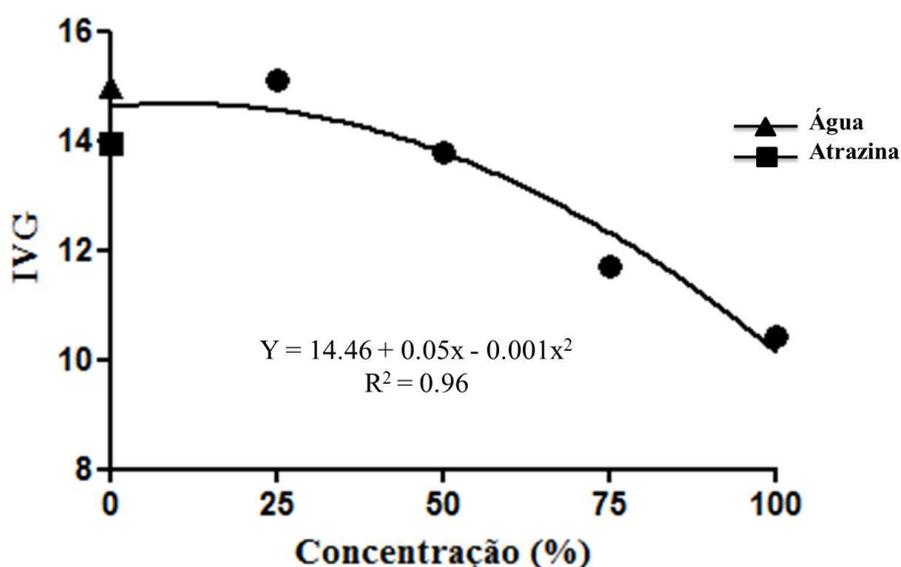
A análise físico-química mostrou que o pH de todas as concentrações esteve próximo ao ideal de germinação (Tabela 1). Tanto a germinação como o crescimento das plântulas é afetado quando o pH é extremamente alcalino ou extremamente ácido, com efeitos deletérios observados em condições de pH abaixo 4 e superior a 10 (EBERLEIN, 1987). Souza Filho, Rodrigues e Rodrigues (1996), propõem que são necessários valores de pH extremos para influenciar significativamente a germinação.

Os valores da osmolaridade de todas as concentrações do EBA de *C. procera* tiveram na faixa ideal para testes de germinação (Tabela 1), recomendados por Gatti, Perez e Lima (2004), para os quais o potencial osmótico de extratos envolvendo testes de germinação não deve ultrapassar - 0,2 Mpa. Ressalta-se que um potencial osmótico elevado pode refletir na germinação das sementes atrasando a velocidade de germinação (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Tabela 1: Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA do caule de *Calotropis procera*.

EXTRATO AQUOSO	CONCENTRAÇÕES (%)	pH	OSMOLARIDADE Mpa
CAULE	25	6,56	- 0,03
	50	6,55	- 0,09
	75	6,40	- 0,15
	100	6,23	- 0,21

O EBA do caule de *C. procera* não afetou a porcentagem de germinação das sementes de alface, entretanto, o IVG foi inibido a partir de 75% de concentração em comparação aos dois controles (Figura 1). A germinação, normalmente, é menos sensível aos aleloquímicos, mesmo quando se utilizam plantas sensíveis como alface (FERREIRA; AQUILA, 2000), mas o efeito alelopático pode ser observado no IVG (FERREIRA, 2004). Este fator pode ter um significado ecológico, pois plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido (JEFFERSON; PENNACHIO, 2005).

Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*

O comprimento do caulículo das plântulas de alface foi estimulado de forma significativa em todas as concentrações do extrato do caule de *C. procera* em relação aos dois controles (Figura 2). Já o comprimento da radícula foi afetado negativamente pelo referido

extrato a partir de 50% de concentração (Figura 3). Cruz, Nozaki e Batista (2000), constataram que a concentração dos extratos são fatores importantes na obtenção de resultados, pois princípios ativos vegetais são instáveis e não se distribuem de forma homogênea na planta.

Figura 2: Comprimento dos caulículos de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*.

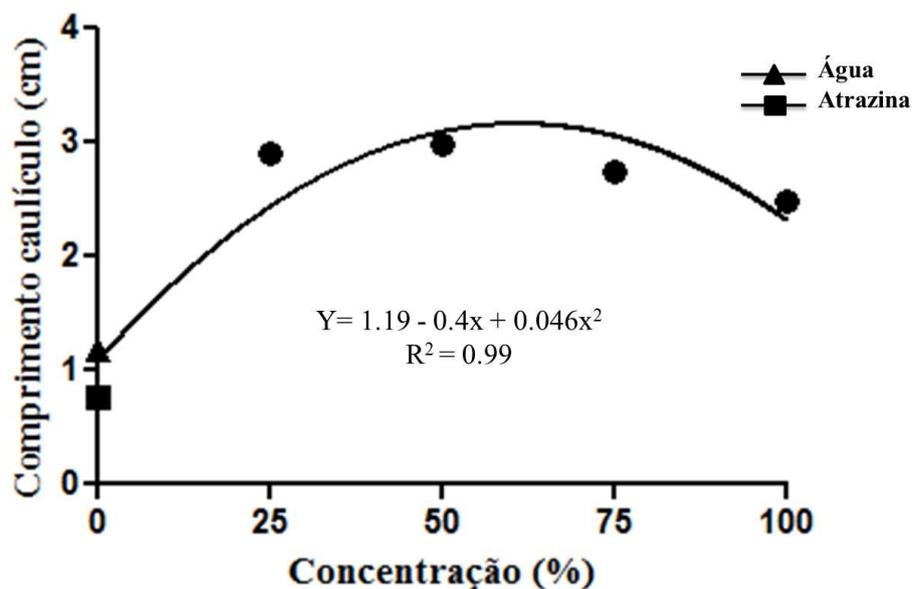
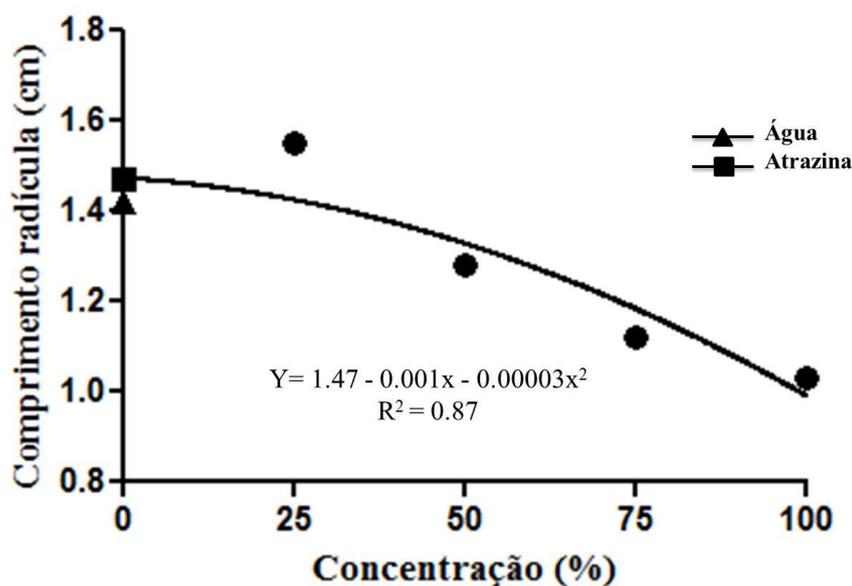


Figura 3: Comprimento das radículas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*.



O extrato aquoso da folha, raiz e caule de *Calotropis gigantea* (L.) Ait. estimulou o desenvolvimento da radícula e das plúmulas de arroz, na concentração de 10%, em comparação

com o controle (OUDHIA; TRIPATHY, 2001).

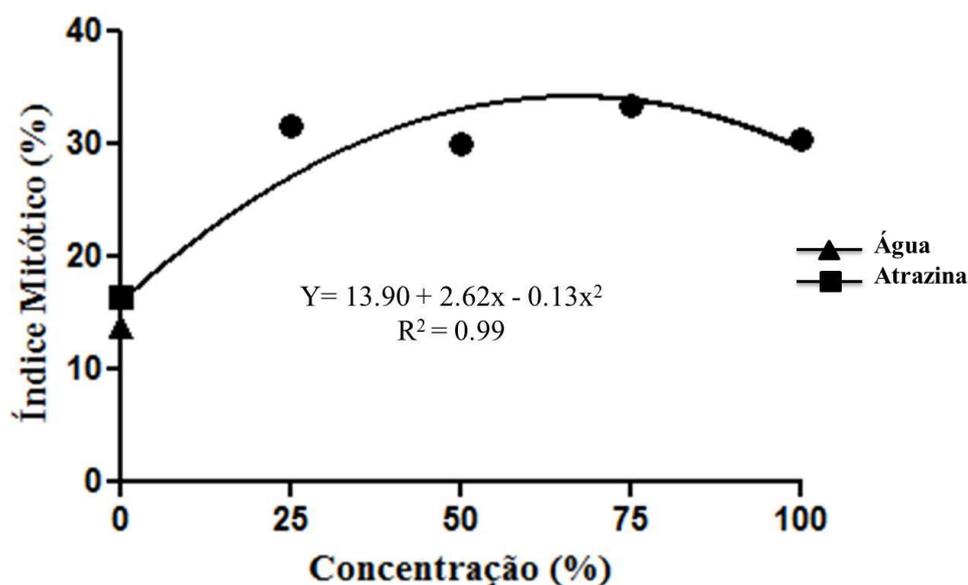
Barros (2008), ao testar o Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) em sementes de *Lactuca sativa*, observou que o crescimento da parte aérea não foi afetado pelo EEB, entretanto, o desenvolvimento das raízes foi inibido nas concentrações de 2000 e 4000 ppm.

Melo (2012), verificou que o extrato hexânico de *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae) a 1000 ppm, foi capaz de estimular o crescimento das radículas de *Lactuca sativa*, entretanto, nenhum efeito foi notado no crescimento médio do hipocótilo. Segundo Chung et al. (2011), as diferentes respostas para ação alelopática observadas entre estruturas radiculares e da parte aérea das plântulas deve-se ao fato de haver maior contato entre as raízes e o extrato (aleloquímicos) do que as demais estruturas das plântulas.

Na presente pesquisa não foram observadas necrose nas radículas das plântulas de *L. sativa* submetidas ao extrato do caule de *C. procera* em nenhuma das concentrações testadas. Existem aleloquímicos que afetam o crescimento das plântulas além de induzir o aparecimento de plântulas anormais, como por exemplo, plantas com partes necrosadas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

O Índice Mitótico das radículas de *L. sativa* submetidas ao extrato aquoso do caule de *C. procera* foi estimulado em todas as concentrações testadas (Figura 4) e não foram observadas alterações cromossômicas.

Figura 4: Índice Mitótico de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato do caule de *Calotropis procera*.



Na prospecção fitoquímica qualitativa, o extrato aquoso do caule de *C. procera* mostrou possuir algumas classes de compostos secundários (Tabela 2), como: flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; flavononóis; leucoantocianidinas; catequinas e flavononas. Brito

et al. (2010), ao realizar a prospecção fitoquímica de frações do látex de *C. procera*, identificou a presença de flavonoides, esteróides e alcaloides. Melo et al. (2001), identificaram no estudo fitoquímico dos galhos de *C. procera* glicosídeos flavônicos, glicosídeos cardiotônicos, esteróides e polifenóis.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EBA do caule de *Calotropis procera*

Pesquisa	EBA de <i>C. procera</i>
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos flabafênicos	-
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	+
Chalconas e auronas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	+
Catequinas	+
Flavononas	+
Alcalóides	-

(+) presente (-) ausente

Os flavonoides representam uma importante classe de polifenóis com forte atividade biológica, entre elas, controle de ação de fitormônios, agentes alelopáticos e inibidores enzimáticos (FORMAGIO et al., 2010).

Além das funções de pigmentos, atrativos ou repelentes de herbívoros, proteção contra radiação UV, os flavonoides apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (RICE, 1984; SAKIHAMA et al., 2002; SHIMOJI; YAMASAKI., 2005).

Chalconas e auronas possuem amplo espectro de atividade biológica e são alvos de vários estudos de isolamento, identificação e investigação de propriedades biológicas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

A análise quantitativa por HPLC do extrato aquoso do caule de *C. procera* revelou a presença de ácido gálico (tR = 10,87 min; pico 1), catequina (tR = 16,05 min, pico 2), ácido clorogênico (tR = 22,13 min; pico 3), ácido caféico (tR = 27,48 min; pico 4), ácido elágico (tR = 34,01 min; pico 5), quercitrina (tR = 44,97 min; pico 6), quercetina (tR = 47,56 min; pico 7), campferol (tR = 53,29 min; pico 8), luteolina (tR = 58,73 min; pico 9) e apigenina (tR = 65,81 min; pico 10) (Figura 5 e Tabela 3).

Os compostos com teores mais representativos da amostra foram, quercitina, o ácido caféico e a quercitrina.

Figura 5. Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato do caule de *Calotropis procera*. O ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico 8), luteolina (pico 9) e apigenina (pico 10).

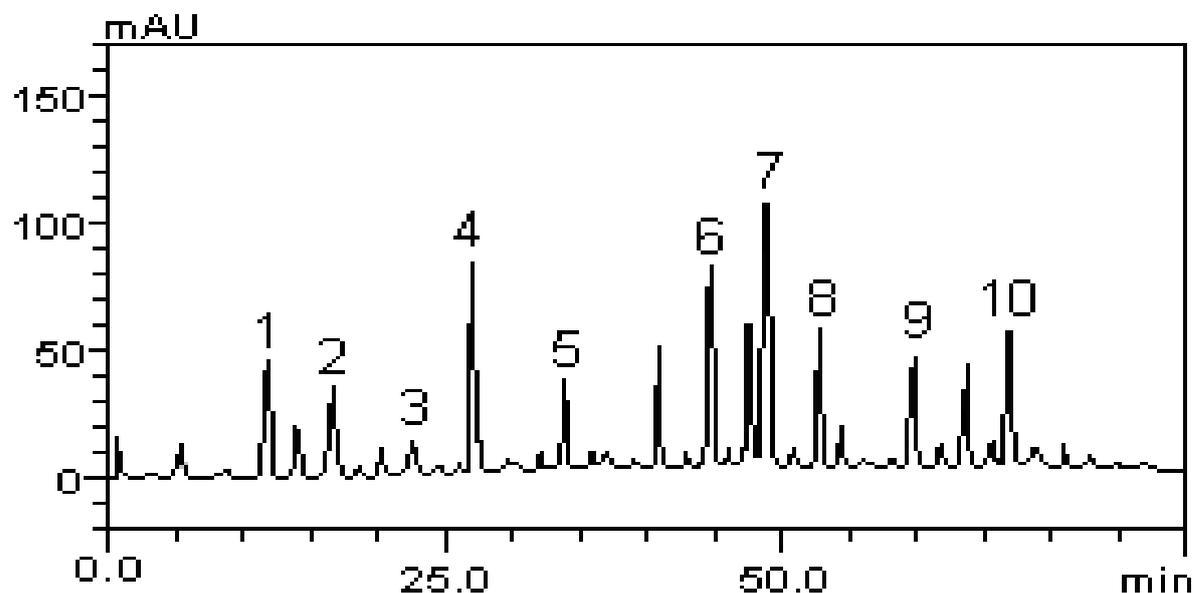


Tabela 3. Composição química do extrato do caule de *Calotropis procera*.

Compostos	LOD	LOQ	
	(mg g ⁻¹)	µg mL ⁻¹	µg mL ⁻¹
Ácido gálico	5,16 ± 0,03 a	0,015	0,053
Catequina	4,32 ± 0,01 b	0,026	0,084
Ácido clorogênico	1,65 ± 0,02 c	0,009	0,031
Ácido caféico	9,27 ± 0,01 d	0,018	0,059
Ácido elágico	4,29 ± 0,01 b	0,013	0,049
Quercitrina	9,03 ± 0,03 d	0,036	0,119
Quercetina	11,42 ± 0,01 e	0,010	0,034
Campferol	6,15 ± 0,02 f	0,025	0,079
Luteolina	5,06 ± 0,02 a	0,007	0,023
Apigenina	6,21 ± 0,01 f	0,014	0,045

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão (DP) de três determinações médias.

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Souza et al. (1998), verificaram que extratos aquosos do capim limão (*Cymbopogon citratus*), que possui entre seus constituintes a quercitina, estimularam o desenvolvimento da radícula de algodão e de milho e inibiram o alongamento da radícula de beldroega (*Portulaca oleracea*) e de picão (*Bidens pilosa*).

O extrato aquoso de folhas de *Morus negra*, que possui o aleloquímico quercitina, apresentou inibição dose-dependente do crescimento radicular da alface nas três maiores concentrações (1mg mL⁻¹, 2mg mL⁻¹ e 4mg mL⁻¹), porém o extrato hexânico, mostrou um efeito alelopático estimulante sobre o crescimento radicular de alface (CONDESSA, 2012).

Os compostos fenólicos, como o ácido caféico, podem interferir no balanço entre substâncias estimuladoras e inibidoras da germinação de sementes, assim como representar obstáculo à difusão de gases em sementes umedecidas (VIEIRA, 1991; MARCOS FILHO, 2005). Efeitos tóxicos do ácido caféico são pronunciados devido a sua grande persistência no solo (SAMPIETRO, 2014).

CONCLUSÃO

- O extrato aquoso do caule de *Calotropis procera* interferiu de modo positivo sobre o desenvolvimento do caulículo e sobre o Índice Mitótico de plântulas de *L. sativa*, e negativamente sobre o Índice de Velocidade de Geminação e desenvolvimento de suas radículas;
- A análise química em HPLC mostrou que o referido extrato apresenta os seguintes flavonoides: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, quercitrina, campferol, luteonina e apigenina.
- A ação alelopática observada pode ser atribuída ao sinergismo dos flavonoides, quercitina e ácido caféico. Análises químicas mais detalhadas poderá propiciar o isolamento de compostos que atuem como potenciais bioherbicidas.

AGRADECIMENTOS

A da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARROS, I. M. C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2008. 194p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BOLIGON, A.A., KUBICA, T.F., MARIO, D.N., DE BRUM, T.F., PIANA, M., WEIBLEN, R., LOVATO, L., ALVES, S.H., SANTOS, R.C.V., ALVES, C.F.S., ATHAYDE, M.L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.35, p.2229-2239, 2013.

BRITO, S. A.; COUTINHO, H. D. M.; BARROS, A. R. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do látex de *Calotropis procera* (Asclepidaceae). **Cadernos de Cultura e Ciências**, v. 2, n. 2, p.31-39, 2010.

CÂNDIDO, A. C. S.; DIAS, A. C. R.; SERRA, A. P.; CHRISTOFFOLETI, J.; SCALON, S. P. Q.; PEREIRA, M. T. L. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 268-272, 2010.

CHUNG, I. M.; AHN, J. K.; YUN, S. J. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, n. 10, p. 921-928, 2001.

COLPO, E.; VILANOVA, C.D.D.A.; REETZ, L.G.B.; DUARTE, M.M.M.F.; FARIAS, I.L.G.; MEINERZ, D.F.; MARIANO, D.O.C.; VENDRUSCULO, R.G.; BOLIGON, A.A.; CORTE, C.L.D.; WAGNER, R.; ATHAYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition** v.30, p.459-465, 2014.

CONDESSA, M. B. **Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais**. 2001. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade de Brasília, 2001.

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Oficial, v.4. 1939.

COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N.; ALVES, A. R.; MEDEIROS, G. R.; Perspectivas de utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Caatinga**, v.22, n.1, p.01-09, 2009.

CRUZ, S. E. M.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 15, p. 28-34, 2000.

EBERLEIN, C. V. Germination of *Sorghum alnum* seeds and longevity in soil. **Weed Science**, v. 35, n. 6, p. 796-801, 1987.

FERNANDES, L. de A. V.; MIRANDA, D. L. C.; SANQUETTA, C. R. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 139-146, abr./jun. 2007.

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

FERREIRA, A.G. Interferência: competição e alelopatia. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação do básico ao aplicado**, Porto Alegre: Artmed, p. 251-262, 2004.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P.; FARIA, T. J. Potenciaçãoealelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, 2007.

FORMAGIO, A. S. N. MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 349-354, 2010.

- GATTI, A.B., PEREZ, S.C.J.G.A., LIMA, M.I.S. Atividade alelopática dos extratos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Acta Botanica Brasílica**, v.18, n. 3, p.459-472, 2004.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.
- HAHLBROCK, J. B. Flavonoids. In: Conn EE. **The biochemistry of plants**. A comprehensive treatise. New York: Academic Press, p.425-591,1981.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. A guide to modern techniques of plant analysis. Londres: Chapman & Hall; 1984. p.288.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531p.
- JEFFERSON, L.V.; PENNACHIO, M. Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. **Journal of Arid Environments**, v.55, p.275-285, 2005.
- LÁZARO, S.F.; FONSECA, L.D.; FERNANDES, R.C.; TOLENTINO, J.S.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R. Efeito do extrato aquoso do algodão de seda (*Calotropis procera* Aiton) sobre a eficiência reprodutiva do carrapato bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.302-305, 2012.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 383 p.
- MAHMOUD, O. M. et al. The effect of *Calotropis procera* on small ruminants. II.Effects of administration of the látex to sheep and goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, p. 251-264, 1979.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005, 495 p.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza. 3 ed: Edições UFC, 2009. 150p.
- MEDEIROS, A. R. M. **Determinação de potencialidades alelopáticas em agroecossistemas**. 1989. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.
- MELO, A. M. M. F. **Estudo químico e atividade biológica de *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae)**. 2012. 177p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- MELO, M. M.; VAZ, F. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNINO, H. M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. , sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.1, p.15-20, 2001.
- OUDHIA, P.; TRIPTHI, R.S. Allelopathic effects of *Ageratum conyzoides* and *Calotropis gigantea* on germination and seedling vigour of rice, **Agricultural Science Digest**, v. 21, n. 1, p. 69-70, 2001.

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

RICE, E.L. **Allelopathy**, second ed. Academic Press, Orlando. 1984. 422p.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.F.; GRACE, S.C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v.177, p.67-80, 2002.

SAMPIETRO, D.A. **Alelopatía. Hipertextos del área de la biología**. Disponível em:<<http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>>. Acesso em 29 set. 2014.

SHARMA, G.K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHIMOJI, H.; YAMASAKI, H. Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 117-119, 2005.

SILVEIRA, H.R.O.; FERRAZ, E.O.; MATOS, C.C.; ALVARENGA, I.C.A.; GUILHERME, D.O.; TUFFI SANTOS, L.D.; MARTINS, E.R.; Alelopatia e homeopatia no manejo da tiririca (*Cyperus rotundus*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 499-506, 2010.

SOUTO, P. C.; SALES, F. C. V.; SOUTO, J. S.; SANTOS, R. V. dos.; SOUSA, A. A. Biometria de frutos e número de sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. no semi-árido da Paraíba. **Revista Verde**, v. 3, n. 1, p. 108-113, 2008.

SOUZA FILHO, A. P. S.; BORGES, F. C.; SANTOS, L. S. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos das substâncias químicas tironina e tironina acetilada. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 205-210, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta Daninha**, v.14, p.93-101, 1996.

SOUZA, L.; CRUZ, M.E.S.; CONSTANTIN, J. Efeitos alelopático de espécies vegetais medicinais sobre espécies silvestres e cultivadas. In: Reunião Anual de Microbiologia agrícola e Plantas Medicinais, 2., 1998, Paraná. **Resumos...** Maringá: UEM, v.1, 1998.

VIEIRA, A.R. **Efeitos de compostos fenólicos na dormência de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e eficiência de tratamentos pré-germinativos**. 1991. 58f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

5. ARTIGO 3

Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L.

Submissão para publicação na *Ciência Rural*

1 **Efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera***
2 **(Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) sobre sementes de *Lactuca sativa* L.**

3 **Allelopathic and cytotoxic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* of root**
4 **(Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) on seeds and seedlings of *Lactuca sativa* L.**

5 **Maria Elizete Machado Generino^I Maria Arlene Pessoa da Silva^{II}**

6
7 I. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da
8 Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil

9 II. Professora da Universidade Regional do Cariri, Crato - CE, Brasil

10
11
12 **RESUMO**

13
14 Definida como uma ação positiva ou negativa entre vegetais, a alelopatia vem sendo
15 usada como subsidio para busca de bioherbicidas na substituição de controle químico na
16 agricultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade alelopática e citotóxica do
17 extrato da raiz de *Calotropis procera* sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*. No
18 bioensaio o Extrato Bruto Aquoso (100 %) foi diluído em água destilada a 25, 50 e 75
19 % de concentração (Tratamentos). Os grupos Controles constaram de água destilada e
20 herbicida (Atrazina). Cada tratamento constou de cinco repetições com 20 sementes
21 cada, totalizando 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em
22 caixas gerbox tendo por substrato duas folhas de papel germitest umedecidos com três
23 mL de cada concentração do EBA e nos grupos Controles água destilada e Atrazina. O
24 experimento foi conduzido em Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de
25 12 horas por sete dias em temperatura constante de 25°C. Os parâmetros analisados

26 foram Porcentagem de Germinação (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG),
27 desenvolvimento do caulículo e radícula, ocorrência de necrose nas radículas, e Índice
28 Mitótico e ocorrência de alterações cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos
29 ao Teste de Regressão Polinomial. Foi realizada ainda a prospecção fitoquímica
30 qualitativa do extrato bruto aquoso de *C. procera* e análise quantitativa em HPLC. O
31 EBA de *C. proceran*ã afetou a germinação de sementes de *Lactuca sativa*, contudo,
32 estimulou o IVG nas concentrações de 25%, 50% e 75%, e inibiu a 100%. O
33 comprimento do caulículo e da radícula foi inibido em todas as concentrações. O Índice
34 Mitótico das radículas de *L. sativa* submetidas ao extrato aquoso foi inibido em todas as
35 concentrações. Modificações estruturais também foram observadas nas radículas das
36 plântulas, como a necrose. A análise fitoquímica qualitativa mostrou que esta espécie
37 possui flavonoides, e na quantitativa a presença de campferol, apigenina e quercetina.
38 Os dados obtidos demonstram que o extrato aquoso da raiz de *C. procera* nas diversas
39 concentrações testadas possui efeito alelopático negativo sobre plântulas de *Lactuca*
40 *sativa* e que tais efeitos podem ser pela presença de campferol, apigenina e quercitina.

41

42 **Palavras-chave:** Alelopatia. Bioherbicida. Citogenética.

43

44 **ABSTRACT**

45 Defined as a positive or negative action between plants, allelopathy has been used as a
46 subsidy to search mycoherbicides in chemical control replacement in agriculture. The
47 objective of this study was to evaluate the allelopathic and cytotoxic activity of
48 *Calotropis procera* root extract on seeds and seedlings of *Lactuca sativa*. In the
49 bioassay Aqueous crude extract (100%) was diluted in distilled water at 25, 50 and 75%
50 concentration (treatment). The groups consisted of distilled water and herbicide controls

51 (Atrazine). Each treatment had five replicates of 20 seeds each, totaling 100 seeds per
52 treatment. The experiment was conducted in boxes gerbox having substrate by two
53 germitest moistened sheets of paper with three mL of each concentration of EBA and
54 groups Controls distilled water and Atrazine. The experiment was conducted in
55 germination chamber BOD with photoperiod of 12 hours for seven days in constant
56 temperature of 25 ° C. The parameters analyzed were percentage of germination (%),
57 Germination Speed Index (GSI), development of caulículo and radicle, occurrence of
58 rotted rootlets, and Mitotic Index and the occurrence of chromosomal alterations. Data
59 were submitted to polynomial regression test. Yet it was carried out a qualitative
60 phytochemical screening of the aqueous crude extract of *C. procera* and quantitative
61 analysis in HPLC. EBA *C. proceranão* affect the germination of *Lactuca sativa* seeds,
62 however, has stimulated the IVG in concentrations of 25%, 50% and 75% and 100%
63 inhibited. The length of the radicle and caulículo was inhibited at all concentrations.
64 The Mitotic Index of *L. sativa* culms submitted to the aqueous extract was inhibited at
65 all concentrations. Structural changes were also observed in sprouts of seedlings, such
66 as necrosis. Qualitative phytochemical analysis showed that this species has flavonoids
67 and quantitative presence of kaempferol, apigenin and quercetin. The data obtained
68 show that the aqueous extract of the root of *C. procera* in the various tested
69 concentrations has a negative allelopathic effect on *Lactuca sativa* seedlings and that
70 this effect may be due to the presence of kaempferol, apigenin and quercetin.

71

72 **Keywords:** Allelopathy. Bioherbicida. Cytogenetics.

73

74

75

76 INTRODUÇÃO

77 O crescimento da população mundial levou ao aumento de demandas de
78 produção de alimentos, e com isso, a agricultura, na década de 60, se caracterizou como
79 monoculturas extensivas e de grande utilização de fertilizantes químicos sintéticos e
80 agrotóxicos (MENEZES, 2005).

81 Porém o uso indiscriminado de agrotóxicos durante várias décadas levou ao
82 acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, contaminação da água e do solo, intoxicação
83 de produtores rurais, surgimento de pragas resistentes, interrupção do sistema de
84 controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos-praga, entre
85 muitos outros problemas (KIM et al., 2003; COSTA, SILVA; FIUZA, 2004;
86 MENEZES, 2005).

87 Atualmente com a ascensão da sustentabilidade e do consumo de alimentos
88 orgânicos, o uso de herbicidas vem sendo reduzido e substituído por produtos naturais.
89 Um dos fenômenos que pode ser utilizado nesta busca é a alelopatia caracterizada pela
90 relação planta-planta através da liberação de metabólitos secundários atuando de forma
91 favorável ou desfavorável.

92 A alelopatia vem se configurando como uma área de pesquisa de grande
93 importância, permitindo buscar substâncias de origem vegetal para o controle de plantas
94 invasoras na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente,
95 preservando os recursos naturais e garantindo a oferta de produtos de qualidade
96 (SOUZA FILHO; ALVES, 2002). Os metabólitos secundários também podem ser
97 precursores de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais (TAIZ;
98 ZEIGER, 2004).

99 *Calotropis procera*, apocynaceae, foi introduzida no Brasil no século passado
100 com fins ornamentais, e desde então tem sido alvo de diversos estudos, principalmente,

101 por apresentar diversas propriedades como a presença de substâncias ativas de uso
102 farmacológico (COSTA et al., 2009)

103 Apesar de ser uma espécie originária da África Tropical e Índia (PIO CORRÊA,
104 1984; MELO et al., 2001), adaptou-se muito bem ao nordeste brasileiro, principalmente
105 em ambientes com baixos níveis de pluviosidade e solos pobres em nutrientes (JOLY,
106 1991; SHARMA; SHARMA, 2000). O sistema radicular é bastante desenvolvido, com
107 raiz principal pivotante podendo atingir de 1,7 a 3,0 m em solos arenosos de desertos
108 (LIMA, 2012).

109 *Calotropis procera*, é utilizada na medicina tradicional para tratamento de uma
110 variedade de doenças, e algumas indicações tem sido confirmadas experimentalmente,
111 validando a eficácia do látex e da casca da raiz, externamente como auxiliar no
112 tratamento de afecções cutâneas, contudo apresenta ação tóxica, se ingerida por tempo
113 prolongado tanto para seres humanos como para animais (MATOS et al., 2011).

114 Considerando a escassez de estudos voltados para a ação alelopática das raízes
115 das diversas espécies vegetais, na presente pesquisa objetivou-se avaliar o efeito
116 alelopático e citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* sobre sementes
117 e plântulas de *Lactuca sativa*.

118

119 MATERIAL E MÉTODOS

120 Coleta do material botânico

121 O material botânico foi coletado na cidade de Crato-CE na localidade das
122 Guaribas, nas coordenadas geográficas 7°13'02''S e 39°26'08''W, o mesmo foi levado
123 ao Laboratório de Botânica Aplicada da Universidade Regional do Cariri. Uma parte
124 deste material foi herborizado e depositado junto ao acervo do Herbário Carirense

125 Dárdano de Andrade-Lima com número de exsicata 2601. O material restante foi
126 utilizado para os bioensaios e na prospecção fitoquímica.

127 **Preparo do extrato bruto aquoso (EBA)**

128 Inicialmente, 100 g de folhas frescas de *C. procera* foram postas para secar em
129 estufa a 70 °C, para estabelecimento da quantidade de água a ser utilizada na produção
130 do extrato a partir da relação entre o peso da matéria seca (PMS) e peso matéria fresca
131 (PMF). Após totalmente secas, as folhas foram pesadas, obtendo assim o PMS de 0,015
132 g, obtendo-se um índice correspondente ao volume de água destilada em mL a ser
133 adicionada no extrato (MEDEIROS, 1989).

$$134 \quad V_{H_2O} = \frac{PMF \times 100}{PMS}$$

135
136
137 Para a produção do EBA foram utilizadas 100 g de raiz fresca trituradas em 204
138 mL de água destilada com auxílio de liquidificador industrial. O material triturado foi
139 filtrado em funil de vidro com algodão, e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 10
140 minutos obtendo-se o EBA a 100%. A partir desta concentração foram feitas diluições
141 em água destilada a 75%, 50% e 25% de concentração (Tratamentos).

142 Para cada concentração foram feitas análises físico-químicas, medição do pH em
143 pHmetro e osmolaridade em osmômetro, onde os valores obtidos em mOsm/kg foram
144 convertidos para pressão osmótica (MPa) através da equação de LARCHER (2004):

$$145 \quad \pi = -W \times 0,00832 \times tabs$$

146 Onde:

147 π = Pressão osmótica em Mpa;

148 W = Potencial Osmótico em Osm/Kg;

149 Tabs = Temperatura absoluta em graus Kelvin.

150

151 **Bioensaio de germinação**

152

153 O experimento constou de quatro tratamentos composto pelo extrato de *C.*
 154 *procera* a 100, 75, 50 e 25% de concentração e dois grupos Controles o primeiro
 155 constando de água destilada e o segundo de Atrazina. O bioensaio foi conduzido em
 156 caixas gerbox de 11 x 11 x 3 cm, tendo por substrato duas folhas de papel germitest
 157 umedecidos com três mL do extrato nas diferentes concentrações. O Delineamento
 158 utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC). O herbicida usado foi o Atrazina, na
 159 formulação comercial SIPTRAN®, com 500 g L⁻¹ de ingrediente ativo, ajustado para a
 160 área da superfície da gerbox, sendo aplicados 6,0 µl por gerbox (SILVEIRA et al.,
 161 2010).

162 Cada tratamento foi composto por cinco repetições de 20 sementes de *Lactuca*
 163 *sativa* num total de 100 sementes por tratamento. O experimento foi conduzido em
 164 Câmara de Germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de
 165 escuro por sete dias em temperatura constante de 25°C.

166

167 **Variáveis analisadas**

168 Foram analisadas as seguintes variáveis: Porcentagem de Germinação (%G).

$$169 \quad G = \frac{N}{A} 100$$

170

171 Onde,

172 *N* = número total de sementes germinadas;

173 *A* = número total de sementes colocadas para germinar

174 Índice de Velocidade de Germinação (IVG) segundo metodologia proposta por
 175 FERNANDES; MIRANDA; SANQUETTA (2007).

$$176 \quad IVG = \sum \left[\frac{ni}{i} \right]$$

177

178 Onde,

179 ni = o número de sementes germinadas no dia;180 i = pelo número de dias

181

182 Desenvolvimentos das plântulas- Sete dias após a germinação foram escolhidas
183 aleatoriamente cinco plântulas de cada placa para a medição da radícula e caulículo e
184 observadas à ocorrência de necrose nas radículas.

185 Índice Mitótico (IM) e presença ou ausência de mutações cromossômicas- Para o
186 Índice Mitótico foi empregada a técnica de esmagamento (GUERRA & SOUSA, 2002),
187 sendo coletadas, no terceiro dia de germinação, 5 radículas de cada placa, fixadas em
188 Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse
189 período as radículas foram transferidas para um Becker e lavadas em água destilada por
190 5 minutos. Em seguida foram imersas em HCl 5M por 20 minutos e lavadas em água
191 destilada para confecção das lâminas.

192 O Índice Mitótico foi calculado segundo metodologia proposta por PIRES et al.
193 (2001).

$$194 \quad IM = \frac{NCM}{NCT} \times 100$$

195 Onde,

196 NCM = número de células em mitose197 NCT = número total de células observadas

198

199 As lâminas contendo células com ocorrência de alterações cromossômicas foram
200 fotografadas com câmera acoplada a microscópio óptico no aumento de 1000x.

201

202

203 **Análise estatística**

204 Para análise estatística dos dados obtidos foi aplicado o Teste de Regressão
205 Polinomial utilizando-se o programa ASSISTAT 7.7 beta (2014).

206

207 **Prospecção Fitoquímica Qualitativa**

208 O extrato bruto aquoso da raiz de *C. procera*, inicialmente foi liofilizado para
209 posterior análise fitoquímica. Os testes de prospecção foram feitos de acordo com a
210 metodologia proposta por MATOS (2009), o qual se baseia em mudança de cor e
211 formação de precipitado pela adição de reagentes específicos.

212

213 **Prospecção Fitoquímica Quantitativa por HPLC**

214 Como a prospecção fitoquímica qualitativa mostrou que o extrato possuía
215 flavonoides, desta classe foi feito o teste quantitativo.

216 As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob as condições de
217 gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de
218 diâmetro de 5 µm; a fase móvel foi de: (A) acetonitrilo: água (95:5, v/v) e (B) de água:
219 ácido fosfórico (98:2, v/v), e o gradiente de composição foi: 5% de A até 10 min e
220 alterada para se obter 20%, 40%, 60%, 70% e 100% de A a 20, 30, 40, 50 e 60 min,
221 respectivamente, seguindo o método descrito por Colpo et al. (2014) com ligeiras
222 modificações. O extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* foi analisado em uma
223 concentração de 10 mg/mL.

224 A presença dos compostos antioxidantes: ácido gálico, catequina, ácido
225 clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e
226 apigenina foi investigada. A identificação destes compostos foi realizada comparando o

227 seu tempo de retenção e o espectro de absorção de radiação UV com a dos padrões de
228 referência.

229 A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, volume de injeção de 40 µL e o comprimento
230 de onda de 270 nm estavam para ácidos gálico e elágico, 280 nm para a catequina, a 327
231 nm para ácidos clorogénicos e cafeico, e 365 nm para a apigenina, luteolina, quercitrina,
232 campferol e quercetina. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de
233 membrana 0,45 µm (Millipore), e, em seguida, desgaseificou-se com um banho de
234 ultrassons antes da utilização. As soluções de referência de normalização foram
235 preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,450
236 mg/mL para a catequina, a quercetina, quercitrina, luteolina, campferol e apigenina, e
237 0,025-0,300 mg/ml para gálico, clorogénico, cafeico e ácidos elágico. Os picos da
238 cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de
239 padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 500 nm). Curva de calibração
240 para o ácido gálico: $Y = 12627x + 1305,9$ ($r = 0,9998$); catequina: $Y = 11948x + 1178,5$
241 ($r = 0,9999$); ácido clorogénico: $Y = 12835x + 1169,2$ ($r = 0,9995$); ácido cafeico: $Y =$
242 $11876x + 1345,9$ ($r = 0,9997$); ácido elágico: $Y = 13670x + 1243,8$ ($r = 0,9994$);
243 apigenina: $Y = 12834x + 1165,4$ ($r = 0,9996$); luteolina: $Y = 11459x + 1379,1$ ($r =$
244 $0,9998$); quercitrina: $Y = 12675x + 1238,7$ ($r = 0,9999$); campferol: $Y = 12705x +$
245 $1189,8$ ($r = 0,9995$) e quercetina: $Y = 13652x + 1283,9$ ($r = 0,9998$). Todas as operações
246 de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicatas. O limite de
247 detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio
248 padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal
249 como definido por Boligon et al. (2013). LOD e LOQ foi calculado como $3,3$ e $10 \sigma/S$,
250 respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de
251 calibração.

252 As diferenças entre os grupos de HPLC foram avaliadas através de análise de
253 variância e teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi definido como p
254 <0,05. Estas análises foram realizadas utilizando o software livre R versão 3.1.1. (R
255 CORE TEAM, 2014).

256

257 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

258 O pH de todas as concentrações estavam na faixa do ideal para os testes
259 alelopáticos (Tabela 1). Efeitos do pH sobre a germinação e o desenvolvimento de
260 plântulas apresentam-se em meios extremamente ácidos ou alcalinos, sendo
261 recomendado o uso de um pH na faixa de 6,0 a 7,5 para experimentos em laboratório
262 (FILHO; RODRIGUES; RODRIGUES, 1997; FILHO; DUTRA, 1998; KERBAUY,
263 2004).

264 O potencial osmótico do extrato aquoso da raiz de *C. procera* em todas as
265 concentrações esteve na faixa o ideal para testes de germinação (Tabela 1),
266 considerando afirmação de GATTI, PEREZ & FERREIRA (2004) que consideram
267 adequados para germinação de sementes em testes alelopáticos valores de potencial
268 osmóticos não superiores a -0,2 MPa.

269 A análise do pH e do potencial osmótico é importante, pois os extratos podem
270 conter solutos como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos que podem mascarar o
271 efeito alelopático dos extratos por interferir no pH e serem osmoticamente ativos
272 (FERREIRA & AQUILA, 2000).

273

274

275

276

277

278 **Tabela 1:** Valores de pH e Potencial Osmótico do EBA da raiz de *Calotropis procera*.

EXTRATO AQUOSO	CONCENTRAÇÕES (%)	Ph	OSMOLARIDADE MPa
RAIZ	25	6,15	- 0,03
	50	6,12	- 0,07
	75	6,10	- 0,11
	100	6,00	- 0,15

279

280

281

282

283

284

O extrato aquoso da raiz de *C. procera* não interferiu na porcentagem de germinação das sementes de *Lactuca sativa*, contudo, estimulou o IVG destas sementes nas concentrações de 25%, 50% e 75%, e inibiu a 100%, quando comparados aos controles água e ao herbicida atrazina (Figura 1).

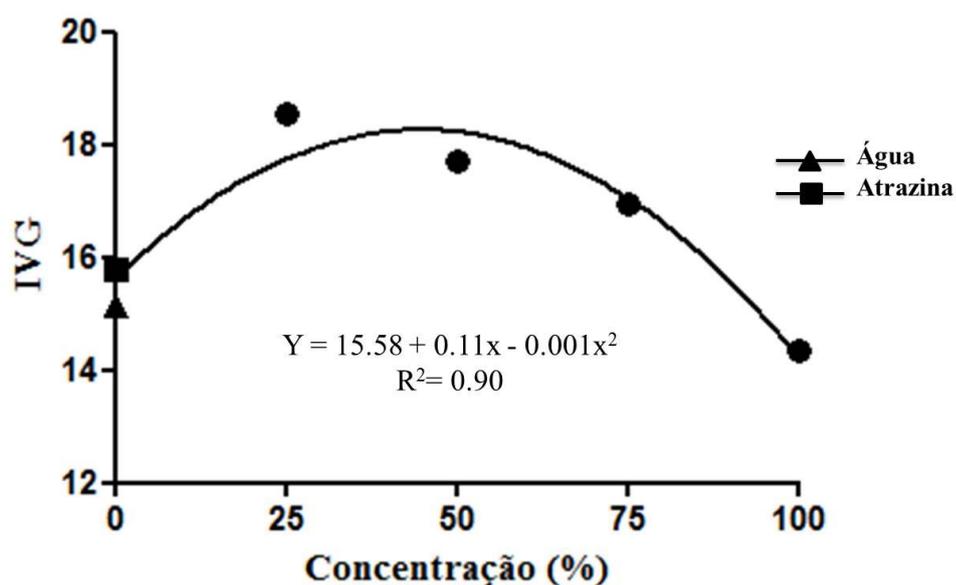
285

286

287

288

Testes realizados por ALVES et al. (2011), mostraram que a germinação de sementes de alface, em contato com extrato de *Tabernaemontana catharinensis*, foi inibida nas concentrações de 5% e 10% e que as médias do IVG decresceram com o aumento das concentrações.



289

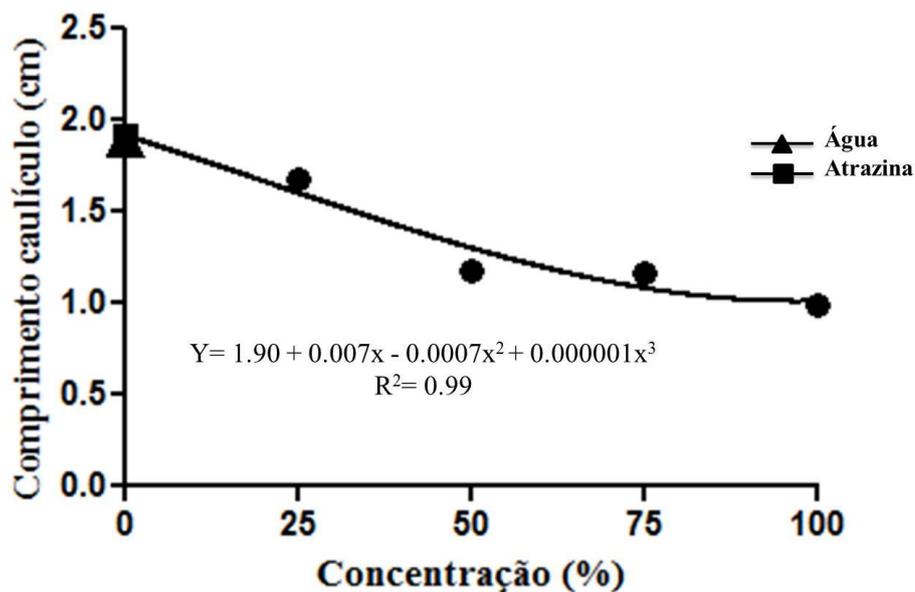
290

291

292

Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis procera*.

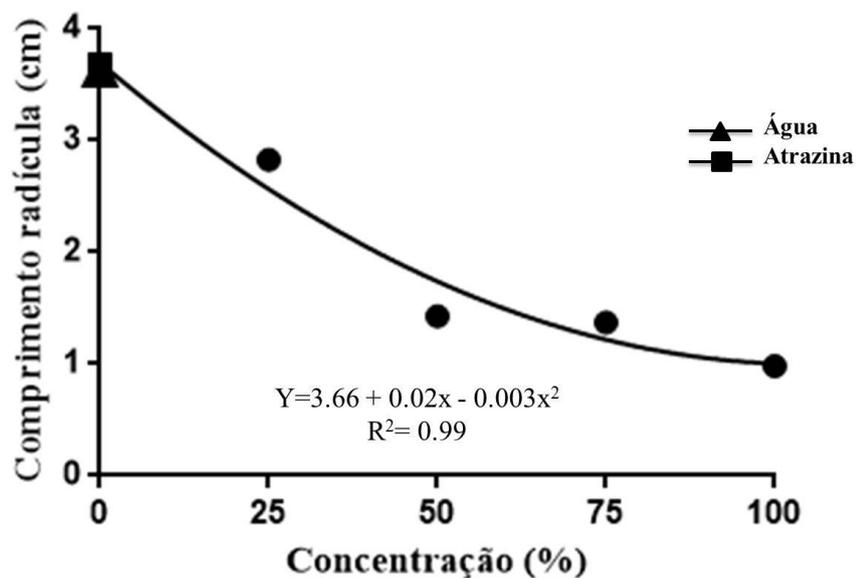
293 O comprimento dos caulículos foi reduzido a 50, 75 e 100%, enquanto que o
 294 desenvolvimento das radículas das plântulas de alface foi inibido em todas as
 295 concentrações testadas quando submetidas ao extrato da raiz de *C. procera*, em relação
 296 aos controles água e herbicida (Figuras 2 e 3).



297

298 **Figura 2:** Comprimento dos caulículos de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de
 299 *Calotropis procera*.

300



301

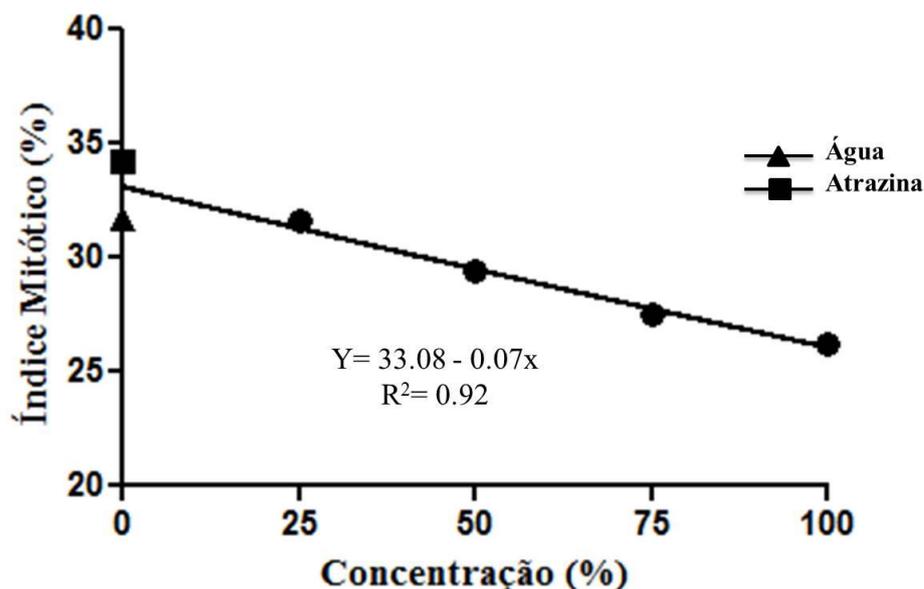
302 **Figura 3:** Comprimento das radículas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de
 303 *Calotropis procera*.

304

305 Pesquisas realizadas por YASIN et al. (2012) com o extrato das folhas de *C.*
 306 *procera*, mostrou redução significativamente, tanto o comprimento da raiz quanto o
 307 comprimento da parte aérea de plântulas de trigo em até 133% e 222%,
 308 respectivamente, quando comparado com água destilada. E por OUDHIA (2000) com o
 309 crescimento da radícula e de plúmulas de *Lathyrus sativus* sendo inibido por extratos de
 310 *Calotropis gigantea* corrobora com os resultados obtidos na presente pesquisa.

311 O extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* conseguiu interferir no
 312 crescimento das radículas de *Lactuca sativa* na concentração de 500 µg/mL, bem como
 313 para os hipocótilos (MELO, 2012).

314 O Índice Mitótico das radículas de *L. sativa* submetidas ao extrato aquoso foi
 315 inibido em todas as concentrações à medida que estas aumentavam em relação aos
 316 controles (Figura 4). A necrose das radículas ocorreu em todas as concentrações
 317 testadas quando comparadas aos controles, tais modificações estruturais são freqüentes
 318 em plântulas submetidas à ação alelopática de algum fator externo.



319

320 **Figura 4:** Índice Mitótico de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato da raiz de *Calotropis*

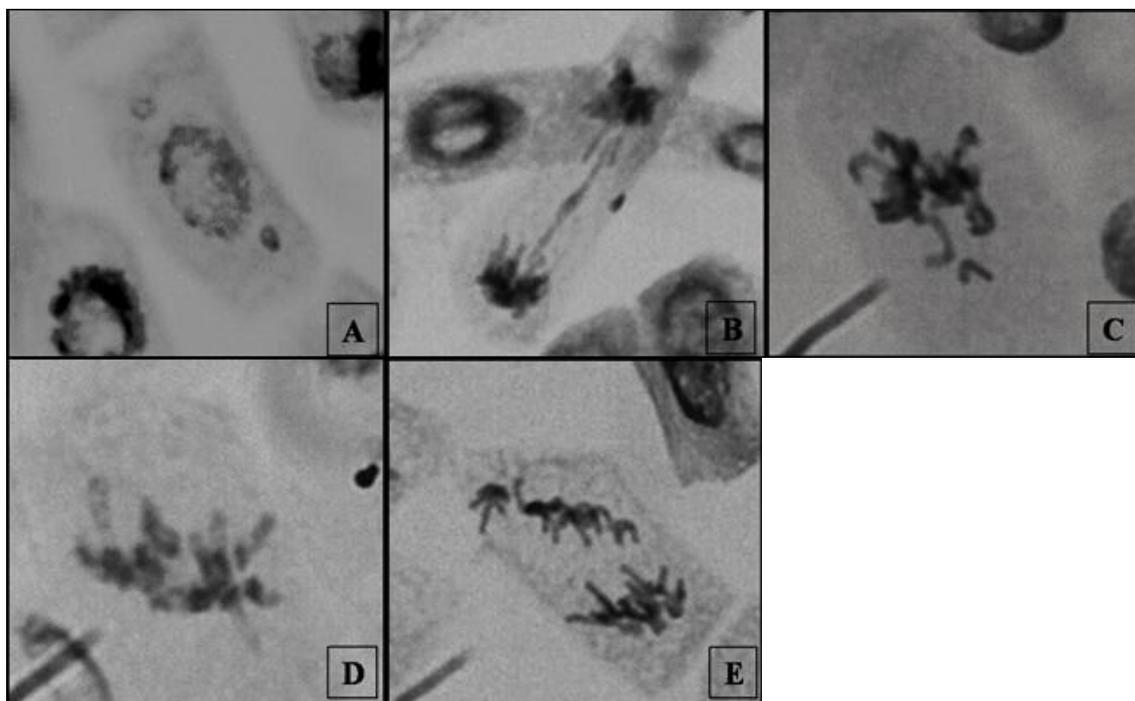
321 *procera*.

322 FERREIRA & AQUILA (2000) afirmam que o crescimento da plântula é mais
323 sensível aos aleloquímicos do que a germinação, pois as substâncias alelopáticas podem
324 induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos
325 sintomas mais comuns.

326 A análise cromossômica mostrou que assim como no herbicida Atrazina (Figura
327 5), alterações cromossômicas foram observadas nas células de radículas submetidas ao
328 extrato nas concentrações a 50% e 100% (Figuras 6 e 7). Pesquisa realizada por
329 VENTURA, FERNANDES, & MARIN-MORALES (2002), comprovaram que o
330 herbicida atrazina induz a formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas em
331 células de *Allium cepa*.

332 A citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias pode ser avaliada,
333 respectivamente, através de alterações no processo de divisão celular sobre o
334 organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas (SOUZA et al., 2005).

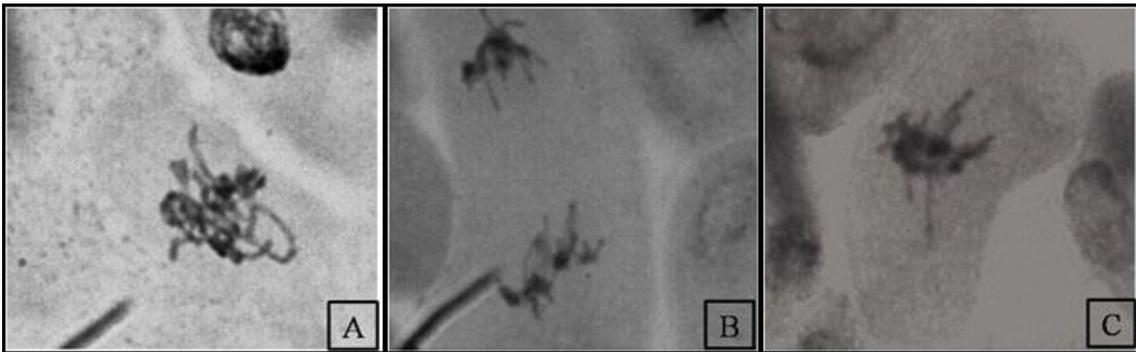
335



336

337 **Figura 5.** Efeito citotóxico do herbicida atrazina em células de *Lactuca sativa*: (A) micronúcleos, (B)
338 ponte anafásica, (C e D) quebra cromossômica na metáfase, (E) anáfase multipolar.

339

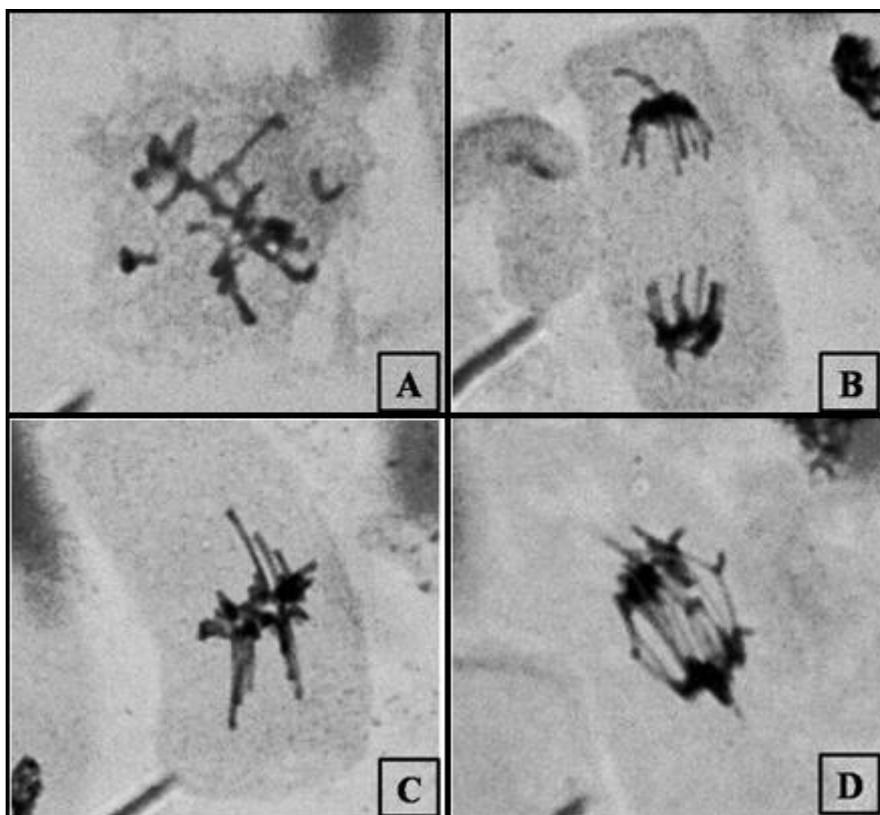


340

341 **Figura 6.** Efeito citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* a 50% em células de *Lactuca*
 342 *sativa*: (A) desorganização da metáfase, (B) anáfase multipolar, (C) aderência cromossômica na metáfase.

343

344



345

346 **Figura 7.** Efeito citotóxico do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* a 100% em células de
 347 *Lactuca sativa*: (A) quebra e perda cromossômica na metáfase, (B) atraso cromossômico, (C) aderência
 348 cromossômica na metáfase, (D) ponte anafásica.

349

350 Alterações cromossômicas originam pontes e, conseqüentemente, quebras
 351 cromossômicas (MARCANO et al., 2004), estes cromossomos quebrados quando
 352 dispersos no citoplasma são envolvidos por membrana formando micronúcleos (MA et al.,

1995). As pontes cromossômicas são decorrentes de aderências, as quais podem ser múltiplas e persistirem até a telófase (GIACOMELLI, 1999).

As anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, o que leva a uma distribuição irregular dos cromossomos, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão normal (RANK & NIELSEN, 1998).

MARCANO et al. (1998), afirmam que a aderência cromossômica é um sinal comum da ação tóxica sobre o material genético e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula.

A prospecção fitoquímica qualitativa, do extrato aquoso da raiz *C. procera* revelou a presença de diversos compostos secundários (Tabela 2) como: flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; flavononóis; leucoantocianinas; catequinas e flavonas.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EBA da raiz de *Calotropis procera*

Pesquisa	EBA de <i>C. procera</i>
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos flabafênicos	-
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	+
Chalconas e auronas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	+
Catequinas	+
Flavononas	+
Alcalóides	-

(+) presente (-) ausente

Os flavonoides participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON & HARRISON, 1990), podendo atuar nos processos relacionados à absorção iônica que pode comprometer o gradiente eletroquímico das membranas celulares das raízes

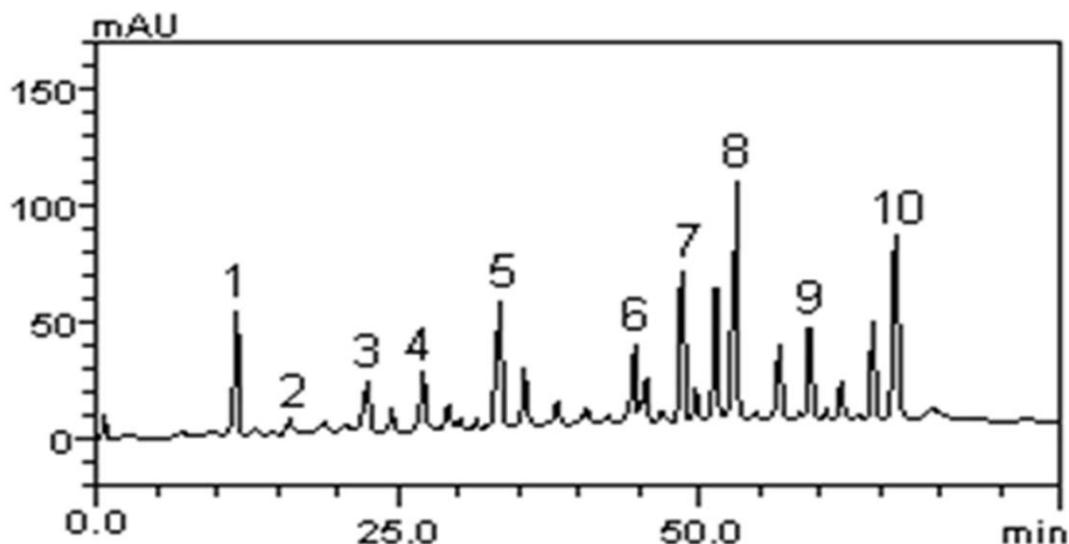
373 (GLASS & DUNLOP, 1974), e dependendo da concentração poderão promover ou
374 inibir o crescimento de raízes (MACIAS et al., 1997).

375 GALLEGOS-OLEA et al. (2008) descrevem a identificação e a caracterização
376 de dois flavonoides glicosilados extraídos das folhas de *C. procera*, isoramnetina-3-)-
377 rutinosídeo e isoramnetina-3-)-ruginobiosídeo, e relatam que algumas das atividades
378 farmacológicas, comprovadas nessa espécie, poderiam ser atribuídas à presença desses
379 metabólitos.

380 As auronas são produtos naturais de reconhecida importância na química
381 medicinal devido as suas diversas atividades biológicas, entre elas atividade analgésica
382 (LAWRENCE et al., 2003), inibidora da tirosinase (OKOMBI et al., 2006), antioxidante
383 (VENKATESWARLU; PANCHAGNULA; SUBBARAJU, 2004), antitumoral e
384 citotóxica (DIMMOCK et al., 2002).

385 A análise quantitativa por HPLC do extrato aquoso da raiz de *C. procera* revelou
386 a presença de ácido gálico (tR = 10,87 min; pico 1), catequina (tR = 16,05 min, pico 2),
387 ácido clorogénico (tR = 22,13 min; pico 3), ácido caféico (tR = 27,48 min; pico 4),
388 ácido elágico (tR = 34,01 min; pico 5), quercitrina (tR = 44,97 min; pico 6), quercetina
389 (tR = 47,56 min; pico 7), campferol (tR = 53,29 min; pico 8), luteolina (tR = 58,73 min;
390 pico 9) e apigenina (tR = 65,81 min;. pico 10) (Figura 5, Tabela 3).

391 O extrato aquoso da raiz de *C. procera* possui teores representativos do
392 composto campferol, seguido de apigenina e quercetina.



393

394 **Figura 8:** Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato da raiz de *Calotropis procera*. O
 395 ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico
 396 (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), campferol (pico 8), luteolina (pico 9) e apigenina (pico
 397 10).

398

399

400

401

Tabela 3: Composição química do extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera*.

Compostos	LOD		LOQ	
	(mg/g)	µg/mL	µg/mL	
Ácido gálico	5,89 ± 0,02 a	0,015	0,053	
Catequina	0,46 ± 0,01 b	0,026	0,084	
Ácido cloragênico	2,97 ± 0,01 c	0,009	0,031	
Ácido caféico	3,01 ± 0,02 c	0,018	0,059	
Ácido elágico	6,04 ± 0,03	0,013	0,049	
Quercitrina	4,11 ± 0,03 e	0,036	0,119	
Quercetina	7,35 ± 0,02 f	0,010	0,034	
Campferol	12,07 ± 0,01	0,025	0,079	
Luteolina	4,36 ± 0,01 e	0,007	0,023	
Apigenina	9,18 ± 0,03h	0,014	0,045	

402

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão (DP) de três determinações médias.

403

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

404

405

406

Os flavonoides naringenina, genisteína e campferol interferem diretamente na

407

absorção de minerais essenciais ao desenvolvimento da planta (EINHELIG, 2000;

408

RICE, 1974).

409 RODRIGUÊS et al. (2010) afirmam que os compostos com atividade alelopática
410 encontrados em folhas de *Senna alata* são substâncias de polaridade muito alta,
411 pertencentes à classe dos flavonoides glicosilados, cujo núcleo aromático é um
412 kaempferol, e que causam inibição intensa, primariamente, sobre o crescimento da
413 radícula e sobre a germinação de *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica*.

414 SANTOS & REZENDE (2007), constatou que genisteína, naringenina e
415 quercetina foram eficazes na inibição da germinação das sementes de malícia, mata
416 pasto e fedegoso.

417 Alguns flavonoides promovem interferência alelopáticas (BAIS et al., 2006),
418 incluindo o campferol, quercetina e naringenina (MACÍAS et al., 2007), e modula os
419 níveis de espécie reativas de oxigênio (TAYLOR & GROTEWOLD, 2005; BAIS et al.,
420 2006), podendo modificar a estrutura da planta como um todo, em resposta a
421 interferências no crescimento da raiz e da parte aérea, e na resposta gravitópica (BUER
422 & DJORDJEVIC, 2009).

423 Em pequenas concentrações, de 10 a 25 $\mu\text{mol/L}$, o composto quercitina atua
424 contra espécies reativas de oxigênio (ERO), prevenindo o processo tumorigênico e, em
425 concentrações mais elevadas, acima de 50 $\mu\text{mol/L}$, tem efeito pró-oxidante e citotóxico,
426 apresentando tendência à indução de apoptose nas células (GARCIA et al., 2012).

427

428 CONCLUSÃO

- 429 • O extrato aquoso da raiz de *Calotropis procera* interferiu de modo
430 negativo sobre o Índice de Velocidade de Germinação nas sementes de *L.*
431 *sativa* na concentração de 100%, assim como no comprimento do
432 caulículo e da radícula, e Índice Mitótico em todas as concentrações;

- 433 • A análise química em HPLC mostrou que o referido extrato apresenta os
434 seguintes flavonoides: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido
435 caféico, ácido elágico, quercitrina, campferol, luteonina e apigenina;
- 436 • A ação alelopática observada pode ser atribuída à ocorrência dos
437 referidos flavonoides, já que os mesmos tem influência no
438 desenvolvimento dos vegetais. Análises químicas mais detalhadas poderá
439 propiciar o isolamento de compostos que atuem como potenciais bioherbicidas.

440

441 **AGRADECIMENTOS**

442 A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-
443 FUNCAP pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

444

445 **REFERÊNCIAS**

- 446 ALVES, L.L.; OLIVEIRA, P.V.A.; FRANÇA, S.C.; ALVES, P.L.C.; PEREIRA, P.S.
447 Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de
448 *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13,
449 n.3, p.328-336, 2011. Disponível em:
450 < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722011000300012>.
451 Acesso em: 01 dez. 2014. doi: 10.1590/S1516-05722011000300012.
- 452
- 453 BAIS, H. P.; WEER, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S; VIVANCO, J. M. The role of
454 root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual of**
455 **Plant Biology**, v. 57, p. 233-266, 2006. Disponível em:
456 < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>>.
457 Acesso em: 01 dez. 2014. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.

458

459 BOLIGON, A.A.; KUBICA, T.F.; MARIO, D.N.; DE BRUM, T.F.; PIANA, M.;
460 WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S.H.; SANTOS, R.C.V.; ALVES, C.F.S.;
461 ATHAYDE, M.L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia*
462 *buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 2229-2239, 2013.
463 Disponível em: < <http://www.researchgate.net/publication/257724995> >. Acesso em: 01
464 dez. 2014. doi: 10.1007/s11738-013-1259-0.

465

466 BUER, C. S.; DJORDJEVIC, M. A. Architectural phenotypes in the transparente test a
467 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 751-763,
468 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652062/>>.
469 Acesso em: 01 dez. 2014. doi: 10.1093/jxb/ern323.

470 COLPO, E.; VILANOVA, C.D.D.A.; REETZ, L.G.B.; DUARTE, M.M.M.F.; FARIAS,
471 I.L.G.; MEINERZ, D.F.; MARIANO, D.O.C.; VENDRUSCULO, R.G.; BOLIGON,
472 A.A.; CORTE, C.L.D.; WAGNER, R.; ATHAYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T. Brazilian
473 nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**,
474 v. 30, p. 459-465, 2014. Disponível em:
475 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607303>>. Acesso em: 06 dez. 2014. doi:
476 10.1016/j.nut.2013.10.005.

477

478 COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de
479 extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 173-185,
480 2004. Disponível em: < <http://www.researchgate.net/publication/228708473>>. Acesso
481 em: 06 dez. 2014.

482

- 483 DIMMOCK, J.R. et al. Correlations between cytotoxicity and topography of some 2-
484 arylidenebenzocycloalkanones determined by X-ray crystallography. **Journal of**
485 **Medinal Chemistry**, v.45, p.3103-3111, 2002. Disponível em:
486 < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm010559p>>. Acesso em: 01 dez. 2014. doi:
487 10.1021/jm010559p.
- 488
- 489 DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes
490 involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, v. 28, p.165-234, 1990.
491 Disponível em:
492 < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065266008605271>>. Acesso em:
493 01 dez. 2014. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60527-1.
- 494 EINHELIG, F.A. Allelopathy – A natural protection, allelochemicals. In: MANDAVA,
495 B.N. **Handbook of natural pesticides methods**, CRC Press, Florida, 2000, v.1, p.161.
496
- 497 FERNANDES, L. de A. V.; MIRANDA, D. L. C.; SANQUETTA, C. R. Potencial
498 alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria*
499 *angustifolia* (Bert.) Kuntze. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 139-146, abr./jun. 2007.
500 Disponível em:
501 < <http://www2.pucpr.br/reol/index.php/ACADEMICA?dd1=1704&dd99=view>>.
502 Acesso em: 01 dez. 2014. doi: academia.pucpr:article/1704.
- 503
- 504 FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia.
505 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 2000, v. 12, p. 175-204. Disponível em:
506 < <http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/v12ne.html>>. Acesso em: 07 dez. 2014.
507

- 508 FILHO, A. P. S.; DUTRA, S. Germinação de sementes de calopogônio (*Calopogonium*
509 *mucunoides*). **Pasturas tropicais**, v. 20, n. 3, p. 26-30, 1998. Disponível em:
510 <<http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/pages/view/Pasturas>>. Acesso em:
511 02 dez. 2014.
- 512
- 513 FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, A. L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Potencial
514 alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Pesquisa**
515 **Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 165-170, 1997. Disponível em:
516 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010083581997000100007>.
517 Acesso em: 02 dez. 2014. doi: 10.1590/S0100-83581997000100007
- 518
- 519 GALLEGOS-OLEA, R.S.; BORGES, M.O.R.; BORGES, A.C.R.; FREIRE, S.M.F.;
520 SILVEIRA, L.M.S.; VILEGAS, W.; RODRIGUES, C.M.; OLIVEIRA, A.V.; COSTA,
521 J.L.. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de**
522 **Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.29-33, 2008. Disponível em:
523 <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_08_1/artigo5v10n1_p29a33.pdf>. Acesso
524 em: 02 dez. 2014.
- 525
- 526 GARCIA, C. S. C.; LAMBERT, A. P. F.; HENRIQUES, J. A. P.; ELY, M. R.
527 Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais.
528 **Scientia Medica**, v. 22, n. 3, p. 131-137, 2012. Disponível em:
529 <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/10790/817>
530 9>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- 531

- 532 GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; FERREIRA, A. G. Avaliação da atividade
533 alelopática de extratos aquosos de folhas de espécies de Cerrado. **Revista Brasileira de**
534 **Biociências**, v. 5, n. 2, p. 174-176, 2007. Disponível em:
535 < <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/255/178>>. Acesso em:
536 02 dez. 2014.
- 537
- 538 GIACOMELLI, F. R. B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de**
539 **Aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região Sul**. 1999. 66p. Dissertação
540 (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual de Maringá, Paraná.
- 541
- 542 GUERRA, M. e SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em**
543 **citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.
- 544
- 545 GLASS, A. D. M.; DUNLOP, J. Influence of phenolic acids on ion uptake: 4.
546 Depolarization of membrane potentials. **Plant Physiology**, v. 54, p. 855-858, 1974.
547 Disponível em: < <http://www.researchgate.net/publication/7122092>>. Acesso em: 02
548 dez. 2014. doi: 10.1104/pp.54.6.855.
- 549
- 550 JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia** vegetal. São Paulo: Editora Nacional,
551 1991. 777p.
- 552 KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 472 p.
- 553
- 554 KIM, S.I. ; ROOH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. Insecticidal activities of
555 aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus*
556 *chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 293-303, 2003. Disponível

- 557 em: < <http://www.researchgate.net/publication/222128100>>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- 558 doi: 10.1016/S0022-474X(02)00017-6.
- 559
- 560 LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531p.
- 561 LAWRENCE, N.; RENNISON, D.; MCGOWN, A. T.; HADFIELD, J. A. The total
- 562 synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: Aurones and flavones as
- 563 anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13 p.3759-3763,
- 564 2003. Disponível em: < <http://www.researchgate.net/publication/9055033>>. Acesso em:
- 565 02 dez. 2014. doi: 10.1002/chin.200408254.
- 566
- 567 LIMA, E. F. **Produtividade e rentabilidade da alface adubada com flor de seda**.
- 568 2012. 66p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal Rural
- 569 de Pernambuco, Serra talhada.
- 570
- 571 MA, T. H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of
- 572 environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995. Disponível
- 573 em: < <http://www.researchgate.net/publication/15314600>>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- 574 doi: 10.1016/0165-1161(95)90010-1.
- 575
- 576 MACIAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; VARELA; R. M.;
- 577 CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars.
- 578 **Phytochemistry**, v. 45, p. 683-687, 1997. Disponível em:
- 579 <<http://www.researchgate.net/publication/222631626>>. Acesso em: 02 dez. 2014. doi:
- 580 10.1016/S0031-9422(97)00011-3.

581

582 MACIAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; GALLINDO, J. C. G.
583 Allelopathy a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p.
584 327-348, 2007. Disponível em: <
585 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1342/abstract>>. Acesso em: 02 dez. 2014.
586 doi: 10.1002/ps.1342.

587

588 MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENTICO, L.
589 Efecto mitotoxico y genotoxico del cadmio en células meristemáticas de *Allium cepa* L.
590 (cebolla). **Ciência**, v. 6, p. 93-99, 1998. Disponível em:
591 < <http://www.urbe.edu/UDWLibrary/PrintSelected.jsp>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

592

593 MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and
594 mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental**
595 **Research**, v.94, p.221-226, 2004. Disponível em:
596 < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393510300121X>>. Acesso em:
597 02 dez. 2014. doi: 10.1016/S0013-9351(03)00121-X

598

599 MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2009. 150p.

600

601 MATOS, F.J.A.; LORENZI, H.; SANTOS, L.F.L.; MATOS, M.E.O.; SILVA, M.C.V.;
602 SOUSA, M.P. **Plantas tóxicas: estudo de fitotoxicologia química de plantas**
603 **brasileiras**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudo da Flora, 2011. 247p.

604

- 605 MEDEIROS, A. R. M. **Determinação de potencialidades alelopáticas em**
606 **agroecossistemas**. Piracicaba: ESALQ, 1989. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia)-
607 Universidade de São Paulo, Piracicaba.
608
- 609 MELO, A. M. M. F. **Estudo químico e atividade biológica de *Tabernaemontana***
610 ***solanifolia* A. DC. (Apocynaceae)**. 2012. 177p. Tese (Doutorado em Ciências da
611 Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília.
612
- 613 MELO, M.M.; VAZ, A. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNI, H.M. Estudo fitoquímico
614 da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos
615 e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.1,
616 p.15-20, 2001. Disponível em:
617 <<http://www.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/602/333>>. Acesso em: 02 dez.
618 2014.
619
- 620 MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso**
621 **agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.
622
- 623 OKOMBI, S.; RIVAL, D.; BONNET, S.; MARIOTTE, A.M.; PERRIER, E.;
624 BOUMENDJEL, A. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as
625 inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. **Journal of Medinal**
626 **Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 329-33, 2006. Disponível em:
627 <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm050715i?journalCode=jmcmr>>. Acesso em: 02
628 dez. 2014. doi: 10.1021/jm050715i.

629

630 OUDHIA, P. Allelopathic effects of some obnoxious weeds on germination and
631 seedling vigor of *Lathyrus sativus*. **FABIS Newsletter**, v.42, p. 32-34, 2000. Disponível
632 em: < <http://eurekamag.com/research/003/354/003354823.php>>. Acesso em: 02 dez.
633 2014.

634

635 PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**.
636 Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 707p, 1984.

637 PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H.T.; FARIA, T. C. L; FILHO, I.A. P;
638 MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de *leucena* sobre o desenvolvimento,
639 índice mitótico, e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de**
640 **Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001. Disponível em:
641 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-31312001000100007>.
642 Acesso em: 02 dez. 2014. doi: 10.1590/S0103-31312001000100007

643

644 RANK, J; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *A.cepa*
645 anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 4148, n. 3. p.
646 113-119, 1998. Disponível em:
647 <[http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00118-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00118-1)>. Acesso em: 02 dez. 2014. doi:
648 10.1016/S1383-5718(98)00118-1.

649

650 RICE, E.L. **Allelopathy**. Academic Press: New York, p.422, 1974.

651

- 652 RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.J.
653 Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade
654 alelopática. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2010. Disponível em:
655 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010083582010000100001>.
656 Acesso em: 02 dez. 2014. doi: 10.1590/S0100-83582010000100001
657
- 658 SANTOS, S.; REZENDE, M. O. O. Avaliação do potencial herbicida de compostos
659 secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens.
660 **Revista Analytica**, v. 32, p. 72:78, 2008. Disponível em:
661 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000119&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000119&pid=S0100-8404200900010001800025)
662 [8404200900010001800025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000119&pid=S0100-8404200900010001800025)>. Acesso em: 02 dez. 2014. doi: S0100-
663 [8404200900010001800025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000119&pid=S0100-8404200900010001800025)>.
664
- 665 SHARMA, B.M. Root systems of some desert plant in Churu in Rajasthan. **The Indian**
666 **Forestes**, v. 94, n. 3, p. 240-246, 1968. Disponível em:
667 <<http://www.indianforester.co.in/index.php/indianforester/article/view/25848>>. Acesso
668 em: 03 dez. 2014.
669
- 670 SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*,
671 **Fitoterapia**, v.71, p.77-79, 2000. Disponível em:
672 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449477>>. Acesso em: 06 dez. 2014.
673
- 674 SILVEIRA, H.R.O.; FERRAZ, E.O.; MATOS, C.C.; ALVARENGA, I.C.A.;
675 GUILHERME, D.O.; TUFFI SANTOS, L.D.; MARTINS, E.R. Alelopatia e
676 homeopatia no manejo da tiririca (*Cyperus rotundus*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p.

- 677 499-506, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582010000300006&script=sci_arttext)
- 678 [83582010000300006&script=sci_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582010000300006&script=sci_arttext)>. Acesso em: 06 dez. 2014. doi:
- 679 10.1590/S0100-83582010000300006
- 680
- 681 SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopátia: princípios básicos e aspectos**
- 682 **gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.
- 683
- 684 SOUZA, S.A.M.; STEIN, V.C.; CATTELAN, L.V.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA,
- 685 B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para
- 686 avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais.
- 687 **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005. Disponível em:
- 688 < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050101>>. Acesso em: 06 dez. 2014.
- 689
- 690 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed. 2004.
- 691
- 692 TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmentol regulators. **Currents**
- 693 **Opinion Plant Biology**, v. 8, p. 317-323, 2005. Disponível em:
- 694 < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526605000373>>. Acesso em:
- 695 06 dez. 2014. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005
- 696

- 697 VENKATESWARLU, S.; PANCHAGNULA, G. K.; SUBBARAJU, G. V. Synthesis
698 and Antioxidative Activity of 3',4',6,7-tetrahydroxy aurone, a Metabollite of *Biden*
699 *frondosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p. 2183-2185, 2004.
700 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502366>>. Acesso em: 06 dez.
701 2014.
702
- 703 VENTURA, B. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação dos
704 efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa*. In:
705 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Águas de Lindóia, 48., 2002, SP.
706 **Resumos...** São Paulo: FAPESP, 2002.
707
- 708 YASIN, M.; SAFDAR, M.E.; IQBAL, Z.; ALI, A.; JABRAN, K.;TANVEER, A.
709 Phytotoxic effects of *Calotropis procera* extract on germination and seedling vigor of
710 wheat. **Pakistan Journal of Weed Science Research**, v. 18, n. 3, p. 379-392, 2012.
711 Disponível em: < <http://www.wssp.org.pk/10.15-2012-galley-proof.pdf>>. Acesso em:
712 06 dez. 2014.
713
714
715
716
717
718
719
720