

**GERMINAÇÃO E ESTRUTURA DAS RAÍZES DE *Calopogonium mucunoides*
DESV. EXPOSTAS A SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE *Urochloa humidicola*
(RENDLE) MORRONE & ZULOAGA E A PADRÕES FENÓLICOS
COMERCIAIS**

RODRIGO BARBOSA BRAGA FEITOZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes-RJ

2016

**“GERMINAÇÃO E ESTRUTURAL DAS RAÍZES DE *Calopogonium mucunoides*
DESV. EXPOSTAS A SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS de *Urochloa humidicola*
(RENDLE) MORRONE & ZULOAGA E A PADRÕES FENÓLICOS
COMERCIAIS.”**

RODRIGO BARBOSA BRAGA FEITOZA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Maura Da Cunha

Co-orientadora: Dr^a Helena Regina Pinto Lima

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO / 2016

**“GERMINAÇÃO E ESTRUTURAL DAS RAÍZES DE *Calopogonium mucunoides*
DESV. EXPOSTAS A SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS de *Urochloa humidicola*
(RENDLE) MORRONE & ZULOAGA E A PADRÕES FENÓLICOS
COMERCIAIS.”**

RODRIGO BARBOSA BRAGA FEITOZA

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA:



Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira - UnB



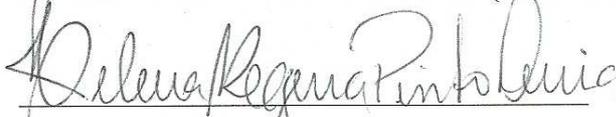
Dra. Claudete Santa Catarina – LBCT/CBB/UENF



Dra. Katia Valevski Sales Fernandes – LQFPP/CBB/UENF



Dra. Maura Da Cunha – LBCT/CBB/UENF (Orientadora)



Dra. Helena Regina Pinto Lima – UFRRJ (Co-orientadora)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual no setor de Biologia Vegetal, e no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, associados ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, e no Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Maura da Cunha e co-orientação da Dra. Helena Regina Pinto Lima com financiamento de apoio à pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e bolsa de Mestrado concedida pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, amparando-me nos meus momentos de fraqueza, e me abençoando ao colocar diante de mim grandes oportunidades e grandes pessoas.

À orientadora Dra. Maura Da Cunha, que me acolheu nessa nova casa que é a UENF nessa nova fase da minha vida, por acreditar no meu potencial e no potencial do trabalho em si, e também por sempre estar disponível nos momentos de necessidade.

À co-orientadora Dra. Helena Regina Pinto Lima, desde 2010, presente na minha vida tanto como professora quanto como amiga, pela grande parceria tanto dentro como fora da Academia, pela valorosa ajuda na discussão deste trabalho e pelas centenas de xícaras de café consumidas durante esse período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da UENF, pelo apoio logístico e acadêmico. Ao corpo técnico do LBCT, especialmente Giovanna Alves e Beatriz Ferreira, pelo suporte e pela amizade.

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ, pelo auxílio financeiro concedido, e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Dr. Mário Geraldo de Carvalho, à Msc. Débora Ramos de Oliveira e equipe, pela enorme colaboração com a fitoquímica da espécie estudada, por cederem gentilmente o extrato foliar da braquiária, e também com a determinação das substâncias fenólicas puras utilizadas neste trabalho.

À Dra. Antônia Elenir Amâncio de Oliveira, aos Msc. Eduardo Alves Gamosa e equipe, pelo auxílio logístico na realização dos bioensaios de germinação.

À Piraí Sementes, pela doação generosa das sementes de calopogônio utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo auxílio na realização de parte das análises em microscopia óptica.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite da referida Defesa, e pelas variadas contribuições ao trabalho.

Aos colegas do laboratório SBV/UENF: Camilla Ribeiro, Fernanda Trindade, Glazielle Campbell, Guilherme Rabelo, Jonas Brito, Saulo Pireda, Warlen Costa e outros, por me ajudarem com inúmeras contribuições, por compartilharem experiências e por serem companheiros ilustres fora da bancada.

Aos colegas ruralinos Kathlyn Gevú, João Kléber Fernandes, Natália Baptista, Sabrina Pereira e aos demais, por terem sido minha “outra família” por tanto tempo.

Ao meu pai Ubiraci (Bira), maior inspirador como pessoa e como biólogo, pelas muitas lições de vida e superação, maior amigo e confidente. Ao meu irmão Luís Felipe, aos poucos se revelando um grande homem, pelos momentos juntos e experiências compartilhadas. A todos os Feitozas (com “z” ou com “s”), estejam eles no Rio de Janeiro ou em Vitória. Orgulho-me sempre de dizer que faço parte dessa família.

Aos amigos que conheci durante o Mestrado em Biociências e Biotecnologia: Jacques Coimbra, Leide Laura Maciel, Milena Mangefeste, Poliana Rangel e outros, por compartilharem comigo as alegrias e os desafios de pós-graduando.

ÍNDICE

RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. <i>Urochloa humidicola</i> (Rendle) Morrone & Zuloaga	2
2.2. Metabólitos secundários e fitotoxidez	4
2.3. Substâncias fenólicas	7
2.3.1. Efeitos sobre germinação, crescimento inicial e morfologia das plântulas	8
2.3.2. Efeitos sobre a ultraestrutura celular e outros processos	9
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Coleta de <i>Urochloa humidicola</i> e obtenção do extrato foliar	13
4.2. Bioensaio de atividade fitotóxica	14
4.3. Preparo para microscopia	16
4.3.1. Microscopia Óptica	16
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	16
4.4. Análises estatísticas	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Germinação de sementes e morfologia externa de indivíduos de <i>Calopogonium mucunoides</i> submetidos aos diferentes tratamentos	18
5.2. Anatomia dos indivíduos de <i>Calopogonium mucunoides</i> após os diferentes tratamentos	22
5.3. Ultraestrutura celular em indivíduos de <i>Calopogonium mucunoides</i> após tratamento com ácido <i>p</i> -cumárico	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Pastagem de <i>Urochloa humidicola</i> (braquiária). Fonte: Roberta C. Ribeiro.....	3
Figura 2: <i>Calopogonium mucunoides</i> (calopogônio). Fonte: Roberta C. Ribeiro.....	4
Figura 3: Gráfico hipotético de Liu <i>et al.</i> (2003), relacionando a Dose (D) de uma determinada substância química com a Resposta (R), a qual pode ser estimulatória (D_m/R_m), nula (D_0/R_c), ou inibitória em nível de 50% do parâmetro avaliado ($D_{50}/0,5R_c$)..	6
Figura 4: Estrutura básica de duas classes de substâncias fenólicas distribuídas amplamente nas plantas. (1) Ácidos hidroxicinâmicos. (2) Flavonoides (Bravo, 1998).	8
Figura 5: Esquema de fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Urochloa humidicola</i> (UHF), utilizando os solventes hexano (UHFH), diclorometano (UHFMD) e acetato de etila (UHFMA) (Oliveira, 2015).....	13
Figura 6: Substâncias encontradas na fração acetato de etila do extrato metanólico de folhas de <i>Urochloa humidicola</i> (Oliveira, 2015): ácido <i>p</i> -cumárico (1), 3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (2), 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (3), 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona (4), e 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilcanferol (5).....	14
Figura 7: Flavonoides utilizados como tratamentos nos bioensaios: quercitrina (1), luteolina (2), fisetina (3) e canferol (4).....	15
Figura 8: Efeito do extrato metanólico de folhas de <i>Urochloa humidicola</i> (UHF), do ácido <i>p</i> -cumárico (APC) e dos flavonoides quercitrina (QUE), luteolina (LUT), fisetina (FIS) e canferol (CAN), sob diferentes concentrações (em ppm), na germinação (n=3) e no deenvolvimento inicial (n=30) de <i>Calopogonium mucunoides</i> . (a) Porcentagem da Germinação (PG). (b) Índice de Velocidade da Germinação (IVG). (c) Comprimento da plântula. (d) Comprimento da parte aérea. (e) Comprimento da raiz. * Indica diferença significativa em comparação ao controle após realização de Teste t de Wilcoxon ($p < 0,05$).	20
Figura 9: Indivíduos de <i>Calopogonium mucunoides</i> após 10 dias sob os diferentes tratamentos. (a) Controle. (b) Extrato metanólico de folhas de <i>Urochloa humidicola</i> (800 ppm). (c) Ácido <i>p</i> -cumárico (800 ppm); setas indicam necrose. (d) Ácido <i>p</i> -cumárico (400 ppm). (e-f) Quercitrina (800 ppm). (e) Aspecto geral. (f) Detalhe das manchas marrons nas	

raízes. (g) Quercitrina (400 ppm). (h) Fisetina (800 ppm). Pontas de seta indicam manchas marrons nas raízes.....21

Figura 10: *Calopogonium mucunoides* - 0,5 cm do ápice radicular (S.T.). (a-b) Raiz de indivíduo controle. (a) Aspecto geral. (b) Detalhe do cilindro central. (c-e) Indivíduo tratado ácido p-cumárico (800 ppm). (c) Aspecto geral. (d) Detalhe do cilindro central, com parênquima medular desenvolvido. (e) Detalhe do xilema e do floema. cc = cilindro central; co = córtex; en = endoderme; ep = epiderme; fl = floema; xi = xilema; pc = parênquima cortical; ri = rizoderme. Barras: a, d = 50 µm; b, e = 25 µm; c= 100 µm..... 24

Figura 11: Efeito do extrato metanólico de folhas de *Urochloa humidicola* (UHF), do ácido p-cumárico (APC) e dos flavonoides quercitrina (QUE), luteolina (LUT), fisetina (FIS) e canferol (CAN), sob diferentes concentrações (em ppm), nas dimensões anatomicas de *Calopogonium mucunoides* a 0,5 cm do ápice (n=25, r=3). (a) Diâmetro total da raiz. (b) Largura do córtex. (c) Diâmetro do cilindro central. * Indica diferença significativa em comparação ao controle após realização de ANOVA seguida de Teste de Tukey (p < 0,05). 25

Figura 12: Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) de células de raízes de *Calopogonium mucunoides*, a 0,5 cm do ápice. (a) Controle. Aspecto geral das células do floema. (b-e) Ácido p-cumárico 800 ppm. (b) Aspecto geral das células parenquimáticas do cilindro central. (c) Detalhe de uma mitocôndria com cristas inchadas e matriz degradada. (d) Detalhe do núcleo degradado. (e) Acúmulo de depósitos (➔). (f) Ácido p-cumárico 400 ppm, evidenciando núcleo degradado. Cc = célula companheira, etc = elemento de tubo crivado, mi = mitocôndria, nu = núcleo. Barras: a, b, d, f = 2 µm; c, e = 1 µm. 27

RESUMO

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae), uma espécie exótica cultivada como forrageira no Brasil, também conhecida como braquiária, tem sido objeto de estudos devido ao potencial fitotóxico dos seus extratos foliares, os quais contêm ácido p-cumárico e flavonoides como fisetina e canferol. Acredita-se que tal potencial justifique a dominância populacional de *Urochloa humidicola* sobre *Calopogonium mucunoides* Desv. (Fabaceae), espécie adotada em pastagens consorciadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação das sementes e caracterizar a morfoanatomia e a ultraestrutura das raízes de *Calopogonium mucunoides* expostas a substâncias fenólicas de folhas de *Urochloa humidicola* e a padrões fenólicos comerciais. As folhas de *Urochloa humidicola* foram secas, trituradas e submetidas a extração por metanol, e ao fracionamento por solventes de polaridade crescente. Para realização dos bioensaios, sementes de *Calopogonium mucunoides* foram germinadas em placas de Petri sob os tratamentos: controle, extrato foliar de braquiária, e solução de ácido p-cumárico e de flavonoides adquiridos comercialmente. O número de sementes germinadas foi avaliado ao longo do bioensaio. Após 10 dias de tratamento, os indivíduos foram mensurados, descritos morfológicamente, e as raízes foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia e ultraestrutura vegetal. Os diferentes tratamentos não exerceram efeito significativo sobre a germinação das sementes de *Calopogonium mucunoides*. O extrato de *Urochloa humidicola* inibiu o desenvolvimento radicular, porém causou aumento do comprimento da parte aérea. O tratamento com ácido p-cumárico 800 ppm foi o que apresentou maior redução do comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz ($p < 0,05$), sendo também observadas necrose no ápice radicular e menor emissão de raízes laterais. Somente nesse tratamento houve alterações na morfologia e ultraestrutura, a 0,5 cm do ápice. Os indivíduos tratados com os flavonoides quercitrina, luteolina e fisetina apresentaram maiores comprimento da parte aérea e da plântula, enquanto os tratados com canferol tiveram uma inibição do desenvolvimento radicular.

Palavras-chave: Braquiária, Poaceae, Anatomia Radicular, Ultraestrutura, Alteração Estrutural.

ABSTRACT

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) is an exotic species cultivated as forage in Brazil, which has been studied due to its phytotoxic potential. Leaf extracts of *Urochloa humidicola* contains *p*-coumaric acid and the flavonoids fisetin and kaempferol. The phytotoxic compounds might justify the *Urochloa humidicola* dominance over *Calopogonium mucunoides* Desv. (Fabaceae), a legume species used in intercropping systems to enhance pasture productivity. The aim of this work was to evaluate seed germination and to characterize morphology, anatomy and ultrastructure of *Calopogonium mucunoides* roots exposed to both phenolic compounds from *Urochloa humidicola* leaves as well as phenolic commercial standards. Leaves of *Urochloa humidicola* were dried, crushed and submitted to extraction in methanol solution, and to fractioning using solvents of crescent polarity. In the bioassays, seeds of *Calopogonium mucunoides* were sown in Petri dishes and treated with control, *Urochloa humidicola* leaf extract of, and commercial standard solutions of *p*-coumaric acid and flavonoids. The number of germinated seeds was evaluated along the bioassay. After 10 days, seedlings were measured, morphologically described, and the roots were processed according to standard techniques in plant anatomy and electron microscopy. The different treatments did not acted significantly on the seed germination of *Calopogonium mucunoides*. *Urochloa humidicola* leaf extracts inhibited root development, although caused an increase on aerial part length. Samples treated with *p*-coumaric acid 800 ppm showed greater reduction of seedling, aerial part and root lengths ($p>0.05$), and presented root tip necrosis and lower production of lateral roots. Changes on morphology and ultrastructure were observed only in samples treated with *p*-coumaric acid 800 ppm. Seedlings treated with quercitrin, luteolin and fisetin showed higher lengths, whereas kaempferol affected negatively root growth.

Keywords: Brachiaria, Poaceae, Root Anatomy, Ultrastructure, Structural Changes.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil depende do consumo de pastagens pelo gado, sejam estas nativas ou cultivadas, correspondendo a 90% da dieta desses animais (Bernardi *et al.*, 2012). As pastagens cultivadas são compostas principalmente por espécies dos gêneros *Panicum* L. e *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae). Inicialmente, as espécies desses gêneros foram escolhidas principalmente por critérios produtivos, desconsiderando a resposta dessas plantas aos variados tipos de estresse (Garcez, 2013).

A espécie *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (= *Brachiaria humidicola*), conhecida popularmente como capim-humidícola ou braquiária, é uma gramínea utilizada com frequência como forrageira no Brasil. Apesar de mostrar boa adaptabilidade e alta produção de fitomassa em curto prazo, o manejo inadequado e a falta de reposição de nutrientes no sistema, principalmente o N, podem causar um processo de declínio de produtividade em longo prazo denominado degradação de pastagem (Werner, 1984; Peron & Evangelista, 2004). Uma via biológica de introdução do N no sistema é a utilização de forrageiras da família Fabaceae em consórcio com as pastagens, graças à interação de bactérias *Rhizobium* com o sistema radicular das espécies da família (Döbereiner, 1997). Na prática, entretanto, os resultados desse consórcio têm sido prejudicados por três fatores principais: i) por características fisiológicas distintas da via fotossintética C₄ das forrageiras tropicais, a qual possibilita maiores taxas de crescimento, em comparação com a via C₃ (Ribeiro, 2012); ii) competição entre as espécies por recursos abióticos (Euclides *et al.*, 1998); e iii) pelo potencial fitotóxico da braquiária. Tal potencial fitotóxico está relacionado com a liberação para o ambiente de metabólitos secundários – também conhecidos como metabólitos especiais, os quais podem interferir no desenvolvimento de outras espécies ou de outros indivíduos da própria espécie (IAS, 1996). Em macro escala são afetadas tanto a distribuição espacial de uma dada espécie nos sistemas ecológicos (Reigosa *et al.*, 2013), como a produtividade dos sistemas agrários (Moonen & Bàrberi, 2005).

A interação da planta com o meio é uma função importante exercida por uma série de substâncias químicas produzidas pelo metabolismo secundário (Hartmann, 2007). Tais moléculas atuam na proteção contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores ou dispersores, e interferem na simbiose planta/micro-organismo e na competição planta/planta (Hartmann, 2007). Muitas moléculas atuam ainda como substâncias fitotóxicas (Macías *et al.*, 2007), e dentre os grupos moleculares que possuem potencial fitotóxico, estão as substâncias

fenólicas, como os ácidos hidroxicinâmicos e os flavonoides (Alves & Santos, 2002; Hartmann, 2007). As mesmas atuam através de interferências na divisão celular, na respiração, na fotossíntese, na permeabilidade da membrana celular e na interação com os fitormônios auxina e citocinina, sendo estes importantes no crescimento e no desenvolvimento da planta (Ferreira & Áquila, 2000; Reigosa *et al.*, 2013).

A raiz tem sido considerada alvo primário para muitas substâncias fitotóxicas devido à alta exposição aos mesmos e à alta susceptibilidade a estresses. Deste modo, é importante observar possíveis alterações estruturais e ultraestruturais nas raízes submetidas às substâncias fitotóxicas (Cruz-Ortega *et al.*, 1998). Os estudos na área da fitotoxidez se fazem necessários frente à grande demanda nas áreas florestal e agrícola, principalmente se considerada a grande importância agrária das espécies cultivadas que podem apresentar potencial fitotóxico (Moonen & Bàrberi, 2005; Reigosa *et al.*, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga

O gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. é constituído de cerca de 100 espécies de origem tropical e subtropical. O presente táxon tem sido constantemente revisto, e alguns trabalhos recomendaram a circunscrição de algumas espécies de *Brachiaria* para o gênero *Urochloa* P. Beauv. (Morrone & Zuloaga, 1992; Torres González & Morton, 2005). No Brasil, como as espécies nativas não apresentam potencial forrageiro (Pizarro *et al.*, 1996), espécies exóticas foram introduzidas, sendo algumas dessas espécies oriundas da África e da Austrália (Garcez, 2013).

A espécie *Urochloa humidicola* (Figura 1), a qual tem origem no leste africano, foi introduzida com sucesso no Brasil graças à resistência à cigarrinha das pastagens, alta produção forrageira e alta adaptação a solos pobres e úmidos, mesmo com alto grau de erodibilidade (Kichel *et al.*, 1999; Peron & Evangelista, 2004; Karia *et al.*, 2006).

Apesar da alta adaptabilidade das braquiárias adotadas como forrageiras no Brasil e da alta fitomassa atingida durante os primeiros anos de sua implantação (Oliveira, 2000), em longo prazo as pastagens sofrem perda de vigor, de produtividade forrageira e de capacidade de recuperação natural. Esse processo é definido como degradação das pastagens, o que as tornam mais susceptíveis a doenças e pragas, e afeta a capacidade de nutrição animal. Esse fenômeno pode ser causado por vários fatores, dentre os quais a falta de reposição dos

nutrientes e o manejo inadequado da pastagem (Werner, 1984; Kichel *et al.*, 1999; Peron & Evangelista, 2004). De acordo com Kichel *et al.* (1999), a perda de matéria orgânica e de nutrientes como N, P, K, Ca e Mg é recorrente nas pastagens degradadas. Estudos salientam a importância da reposição desses nutrientes, especialmente do N, considerado o nutriente mais limitante na produção vegetal (Oliveira, 2000; Garcez, 2013).



Figura 1: Pastagem de *Urochloa humidicola* (braquiária). Fonte: Roberta C. Ribeiro.

Para introduzir o N no sistema de pastagens de modo a superar a degradação, duas alternativas têm sido adotadas, a adubação química e adubação verde. A adubação química tem se mostrado cara, ineficiente, e apresenta risco de poluição de águas subterrâneas devido à lixiviação desses fertilizantes (Döbereiner, 1997; Bernardi *et al.*, 2012). Uma alternativa, denominada adubação verde, que tem se tornado mais eficaz e sustentável, é a utilização de forrageiras da família Fabaceae em consórcio com as pastagens formadas por espécies de Poaceae. As espécies de Fabaceae apresentam associações simbióticas entre seu sistema radicular e bactérias fixadoras de N₂, principalmente com bactérias do gênero *Rhizobium* Frank (Döbereiner, 1997; Perin *et al.*, 2004). Para esse fim, espécies de leguminosas com potencial forrageiro têm sido adotadas, tais como: *Stylosanthes capitata* Vogel., *Desmodium ovalifolium* Guill. & Perr. e *Calopogonium mucunoides* Desv. (Oliveira, 2000).

A espécie *C. mucunoides* (Figura 2) apresenta hábito rasteiro e trepador, e é típica do Cerrado brasileiro, ocorrendo também na América Central e na Índia. Tal leguminosa tem sido utilizada na adubação verde e como forrageira, tendo capacidade de acumular mais de 300 kg/ha de N entre 12-14 semanas (Seiffert *et al.*, 1985; Euclides *et al.*, 1998; Camargos, 2007).



Figura 2: *Calopogonium mucunoides* (calopogônio). Fonte: Roberta C. Ribeiro.

A implantação desse consórcio, contudo, tem apresentado pouco sucesso desde a década de 70 (Ribeiro, 2012). De acordo com Paciullo *et al.* (2003), o relativo fracasso da consorciação se deve pela menor persistência das espécies de Fabaceae nas pastagens. Euclides *et al.* (1998) relataram que, em um consórcio de *C. mucunoides* com *Urochloa decumbens* Stapf. e *U. brizantha* (Hochst.) Stapf., a porcentagem da massa seca do calopogônio diminuiu ao longo do tempo. Para os autores, isso se sucedeu tanto devido à competição por água, luz e nutrientes, quanto pela desvantagem de *C. mucunoides* na eficiência fotossintética. Muitas espécies de Poaceae utilizadas nas pastagens adotam a via C₄, a qual apresenta maior eficiência metabólica que a via C₃, o que confere a estas plantas maior agressividade em comparação com as espécies de Fabaceae utilizadas nos consórcios (Ribeiro, 2012). Outro fator que pode prejudicar o sucesso desse consórcio é o potencial fitotóxico de metabólitos secundários das espécies do gênero *Urochloa*, o que pode prejudicar a manutenção das pastagens consorciadas (Euclides *et al.*, 1998; Ribeiro, 2012).

2.2. Metabólitos secundários e fitotoxidez

Os metabólitos secundários ou especiais têm origem a partir de substâncias do metabolismo primário, a partir do qual passam por vias especializadas para formar uma grande diversidade dessas micromoléculas (Hartmann, 2007). Tais substâncias começaram a receber maior atenção somente a partir do século XX, com o aparecimento de novas metodologias para o isolamento, a purificação e a elucidação das estruturas, possibilitando

maior entendimento das suas funções e efeitos nas plantas (Macías *et al.*, 2007). Estas substâncias apresentam grande importância ecológica, pois atuam na proteção contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores ou dispersores, e interferem na simbiose planta/micro-organismo e na competição planta/planta (Hartmann, 2007).

Os primeiros relatos de uma planta exercendo interferência no crescimento de outras foram realizados na Grécia Antiga, além de registros antigos na China, Índia e Japão (Rizvi *et al.*, 1992). Demócrito (séc. III A.C.) já mencionava o uso de produtos naturais no controle de pragas. Por sua vez, Teofrasto (séc. III A.C.) escreveu em seu livro *Historia Plantarum* que o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) causava o esgotamento do solo e tinha efeito fitotóxico sobre plantas invasoras. Plínio (séc. I D.C.) também escreveu, em sua enciclopédia, exemplos de tais interações na agricultura, e observou, por exemplo, que o grão-de-bico e a cevada (*Hordeum vulgare* L.) afetavam plantações de milho (*Zea mays* L.).

Essa interação, que é caracterizada pela atividade de metabólitos secundários liberados ao ambiente a partir do organismo que os produzem (algas, fungos, bactérias ou plantas) sobre o desenvolvimento de indivíduos de outras espécies ou da própria espécie, é denominada alelopatia (do grego *allelon* = de um para outros, e *pathós* = sofrer) (IAS, 1996). No caso das plantas, a liberação dos metabólitos secundários que apresentam essa atividade ocorre através de lixiviação, volatilização, exsudação radicular e decomposição de resíduos (Ferreira & Áquila, 2000; Reigosa *et al.*, 2013).

De acordo com Ferreira & Áquila (2000) e Reigosa *et al.* (2013), para um estudo ser considerado alelopático, os bioensaios em laboratório devem imitar os processos que liberariam essas moléculas no ambiente. Deste modo, a lixiviação foliar pode ser “simulada” pela extração aquosa. Os bioensaios que adotam solventes orgânicos não-naturais, como hexano, diclorometano e metanol, na obtenção dos extratos, não podem ser considerados estudos alelopáticos, sendo denominados estudos fitotóxicos. Além disso, os ensaios em laboratório têm outra limitação; essa abordagem desconsidera uma gama de interações, tanto fisiológicas como ecológicas, ocorrentes na natureza. Embora tanto o bioensaio como a extração por solventes de diferentes polaridades não representem fielmente o que ocorre no ambiente, tais metodologias são importantes na identificação e na obtenção de substâncias bioativas, ampliando o conhecimento do potencial fitotóxico da planta (Souza Filho *et al.*, 2010; Scognamiglio *et al.*, 2013).

A fitotoxidez é particularmente importante do ponto de vista agrário, visto que têm sido observados efeitos de uma cultura sobre outra (Moonen & Bàrberi, 2005). Em rotação de culturas, substâncias liberadas no solo pela cultura anterior podem afetar a produtividade da

cultura seguinte. Restos de plantas e plantas invasoras também podem exercer tal efeito (Ferreira & Áquila, 2000). A observação de efeitos deletérios entre culturas e invasoras tem colaborado para o desenvolvimento de pesticidas naturais com base nos metabólitos secundários envolvidos (Rizvi *et al.*, 1992).

Segundo Dayan *et al.* (2000), toda substância fitotóxica necessita de um limiar de concentração para exercer fitotoxicidade em uma planta-alvo. De acordo com Liu *et al.* (2003) e An (2005), os aleloquímicos em geral podem exercer efeito positivo (estimulatório) em baixas concentrações; contudo, os efeitos negativos (inibitórios) aumentam com a concentração da substância fitotóxica, como melhor exposto na Figura 3.

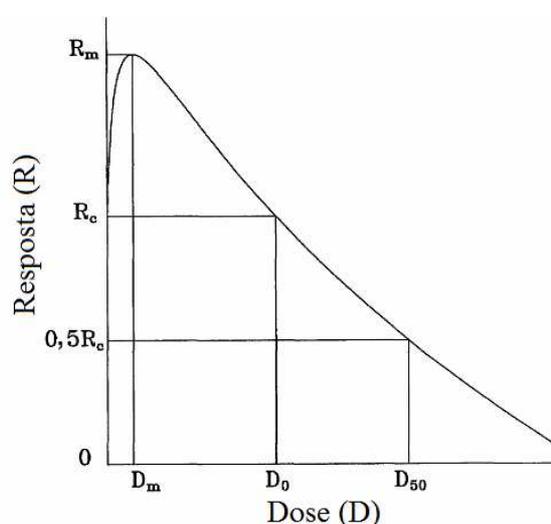


Figura 3: Gráfico hipotético de Liu *et al.* (2003), relacionando a Dose (D) de uma determinada substância química com a Resposta (R), a qual pode ser estimulatória (D_m/R_m), nula (D_0/R_c), ou inibitória em nível de 50% do parâmetro avaliado ($D_{50}/0,5R_c$).

As espécies de *Urochloa* spp. têm sido objeto de estudos devido ao potencial fitotóxico de raízes e folhas. Senarathne *et al.* (2010) observaram que extratos aquosos de raízes de *U. brizantha* inibiram a germinação e o desenvolvimento radicular inicial de *Crotalaria juncea* L., uma espécie da família Fabaceae utilizada na adubação verde. No trabalho de Souza Filho *et al.* (1997), extratos aquosos da parte aérea de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. humidicola* tiveram efeito negativo sobre a germinação e o alongamento da radícula de três espécies de Poaceae forrageiras.

Outros trabalhos isolaram substâncias que apresentavam potencial fitotóxico, como Souza Filho *et al.* (2005), que isolaram o ácido *p*-cumárico a partir da parte aérea de *U. humidicola*; e Santos *et al.* (2008), que encontraram os triterpenos friedelina e epifriedelinol em extratos metanólicos foliares. Tais substâncias causaram inibição da germinação e do

desenvolvimento inicial das espécies daninhas malícia (*Mimosa pudica* L.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby) (Santos *et al.*, 2008).

2.3. Substâncias fenólicas

Os metabólitos especiais mais estudados são os terpenoides, as substâncias nitrogenadas (alcaloides) e as fenólicas (Alves & Santos, 2002; Hartmann, 2007). As substâncias fenólicas têm origem tanto através da via do chiquimato, que produz principalmente fenilpropanoides, como pela via do acetato/malonato, ou ainda pela combinação das duas vias. Os fenois podem ser divididos em classes de acordo com o seu esqueleto básico. Alguns exemplos de classes de substâncias fenólicas são os ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, naftoquinonas e lignanas (Bravo, 1998; Cheynier *et al.*, 2013).

As substâncias fenólicas de esqueleto básico C₆-C₃, derivadas dos fenilpropanoides, têm como principais representantes os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 4), como por exemplo, os ácidos cinâmico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e cafeico. Esses são intermediários importantes na síntese dos flavonoides e dos monômeros que compõem a lignina (Bravo, 1998; Quideau *et al.*, 2011; Cheynier *et al.*, 2013).

Os flavonoides (Figura 4) têm uma origem biossintética mista a partir da combinação dos precursores da via do chiquimato e da via do acetato/malonato (Lima & Kaplan, 2010; Quideau *et al.*, 2011). Essas micromoléculas podem ser encontradas tanto no interior das células de muitos tecidos, como na superfície de alguns órgãos (Bravo, 1998; Cheynier *et al.*, 2013). Alguns dos tipos de flavonoides mais comuns são as flavonas (apigenina, luteolina), as flavononas (naringenina), os flavonois (quercetina, rutina e canferol) e as antocianinas (Quideau *et al.*, 2011). Nas plantas, os flavonoides exercem defesa contra herbívoros e patógenos, oferecem proteção contra os raios UV solares, e controlam o teor de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células (Mierziak *et al.*, 2014). Nos sistemas animais, apresentam importância pelas atividades bactericida, antifúngica, antiviral e anticancerígena, sendo importantes na produção de fármacos (Weston & Mathesius, 2013).

As substâncias fenólicas podem ser liberadas ao ambiente natural através de exsudação radicular e decomposição de seus tecidos. Para Djurdjevic *et al.* (2012), uma das fontes de acúmulo de fenois no solo é a decomposição da lignina em seus constituintes fenólicos de menor peso molecular, os quais podem exercer fitotoxidez.

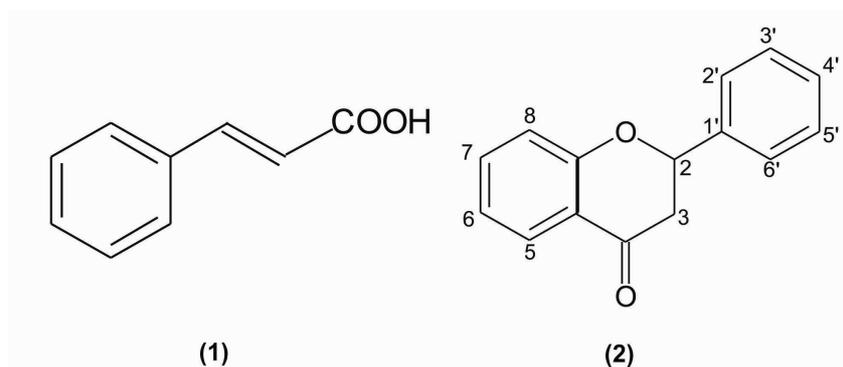


Figura 4: Estrutura básica de duas classes de substâncias fenólicas distribuídas amplamente nas plantas. (1) Ácidos hidroxicinâmicos. (2) Flavonoides (Bravo, 1998).

2.3.1. Efeitos sobre germinação, crescimento inicial e morfologia das plântulas

Souza Filho *et al.* (2005) e Ribeiro (2012) identificaram substâncias fenólicas em extratos foliares de *U. humidicola*, dentre as quais os ácidos cinâmico, *p*-cumárico e flavonoides. Após os bioensaios realizados, constatou-se que o ácido cinâmico inibiu a germinação, enquanto o *p*-cumárico inibiu o crescimento longitudinal da raiz de diferentes plantas daninhas. Os flavonoides também apresentam efeitos sobre a inibição do desenvolvimento inicial de plantas-alvo, por exemplo, a tricina, substância encontrada em algumas espécies de Poaceae, como o milho e o arroz (Gomaa & AbdElgawad, 2012), e o flavonol quercetina, que inibe o desenvolvimento *in vitro* da raiz de *Medicago truncatula* Gaertn. (Cheynier *et al.*, 2013).

A avaliação da germinação das plantas-alvo é frequentemente utilizada nos ensaios com substâncias fitotóxicas, e os parâmetros adotados para avaliar a germinação têm sido a germinação total e o índice de velocidade da germinação (Ferreira & Áquila, 2000; Ladhari *et al.*, 2013; Daneluzzi *et al.*, 2014). De fato é comum observar tanto a inibição da germinação como a redução da velocidade da germinação de sementes submetidas às substâncias fenólicas (Einhellig, 2004; Souza Filho *et al.*, 2005; Ribeiro, 2012). Os efeitos negativos sobre a germinação podem estar relacionados com a inibição da atividade das giberelinas devido à sua interação com os fenois. Essa classe de fitormônios regula enzimas relativas à germinação, dentre estas a α -amilase, enzima responsável pela mobilização de reservas de amido da semente (García-Sánchez *et al.*, 2012; Sunmonu & Van Staden, 2014).

O ápice radicular é considerado a região mais sensível da raiz. É frequente a ocorrência de necrose do ápice de raízes expostas a substâncias fitotóxicas (Einhellig, 2004; Scognamiglio *et al.*, 2013). Dentre os estudos que avaliaram a anatomia dessa região, Cruz-

Ortega *et al.* (1998) observaram a redução de tamanho das células do meristema apical após a aplicação de extrato aquoso de *Sicyos deppei* G. Don. (Cucurbitaceae). Pina *et al.* (2008) e Cipriani *et al.* (2014) relataram que substâncias fitotóxicas afetaram a densidade de pêlos absorventes. Chon *et al.* (2002) observaram que as raízes de *Medicago sativa* L. (alfafa), após tratamento com extratos aquosos da própria alfafa ou com a cumarina, apresentaram inibição da divisão e do alongamento celular, e maior diâmetro total. Os autores atribuíram essa variação ao aumento do número de camadas corticais e ao maior diâmetro do cilindro central. A ocorrência de raízes curtas, espessas e deformadas nas plantas submetidas às substâncias fenólicas apresenta relação com a interação entre fenóis e hormônios vegetais (Einhellig, 2004). Duas classes de fitormônios, em especial, estão estritamente relacionadas com o desenvolvimento da planta: as auxinas e as citocininas. As auxinas promovem o crescimento do meristema apical da raiz, o alongamento da raiz e a diferenciação das raízes laterais (Katekar & Geissler, 1980; Werner *et al.*, 2003; Teale *et al.*, 2005), ao passo que as citocininas inibem tanto o crescimento da raiz principal quanto o surgimento das laterais (Hewelt *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 2001, 2003). Em conjunto, ambas regem o crescimento do corpo da planta através da regulação da divisão celular, da mobilização de nutrientes e da diferenciação dos tecidos condutores – xilema e floema (Aloni *et al.*, 2006).

De acordo com Souza Filho & Alves (2002), monofenóis como os ácidos cinâmico e *p*-cumárico tendem a estimular a descarboxilação da auxina, diminuindo os níveis da mesma. Os flavonoides que contêm o anel B monohidroxilado, como o canferol, estimulam a degradação do hormônio através da estimulação da AIA-oxidase, enquanto os flavonoides contendo o anel B dihidroxilado, como a quercetina, atuam como inibidores desse mesmo processo (Stafford, 1991; Mathesius, 2001; Cheynier *et al.*, 2013). Dessa forma, a interação das substâncias fenólicas com os fitormônios pode interferir no alongamento radicular e na emissão de raízes laterais, o que justifica a ocorrência de raízes curtas, espessas e disformes (Chon *et al.*, 2002; Souza Filho & Alves, 2002; Einhellig, 2004; Cheynier *et al.*, 2013; Sunmonu & Van Staden, 2014).

2.3.2. Efeitos sobre a ultraestrutura celular e outros processos

Alguns autores observaram alterações na ultraestrutura celular após tratamento com substâncias fenólicas, tais como mudanças na forma do núcleo e dos plastídios, além de grande vacuolização, em células do ápice radicular tratadas com extrato aquoso de *Sicyos deppei* G. Don. (Cruz-Ortega *et al.*, 1998), e com as benzoxazolinonas BOA e DIBOA

(Burgos *et al.*, 2004). Outros autores também observaram reduções no índice mitótico das células afetadas (Gniazdowska & Bogatek, 2005; Souza *et al.*, 2005).

Estudos apontam que o ácido cinâmico e seus derivados causam um incremento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na peroxidação lipídica das membranas celulares (Ye *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica pode ser avaliada utilizando como base os teores de malondialdeído – MDA (Sunmonu & Van Staden, 2014). Em resposta ao incremento de radicais livres, pode ocorrer aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (García-Sánchez *et al.*, 2012). Os autores destacaram sua importância tanto na redução dos teores de EROs como na lignificação da parede celular. Esse último processo utiliza os próprios ácidos hidroxicinâmicos como substâncias fenólicas precursoras. Com a lignificação, o alongamento celular é reduzido e o crescimento vegetal pode ser comprometido (Bubna *et al.*, 2011).

Muitas substâncias fenólicas afetam outros processos fisiológicos. Os ácidos hidroxicinâmicos podem afetar a capacidade das raízes de obter água, íons e outros nutrientes (Baziramakenga *et al.*, 1997; Einhellig, 2004; Li *et al.*, 2010), inibir a síntese da clorofila e fotossíntese (Reigosa *et al.*, 1999; Hussain & Reigosa, 2011), assim como a transpiração (Blum & Geric, 2005). A produção de ATP nas mitocôndrias também é afetada (Takahashi *et al.*, 1998). Outros processos afetados por essas substâncias são a síntese de proteínas, a atividade enzimática e o potencial hídrico (Reigosa *et al.*, 1999; Einhellig, 2004; Li *et al.*, 2010).

Ferreira & Áquila (2000) ressaltam ser fundamental a observação e a descrição de possíveis alterações morfológicas provenientes do tratamento com tais substâncias para o maior entendimento da fitotoxidez dos mesmos. Essas observações podem utilizar como base a raiz, visto que seu crescimento inicial apresenta altas taxas metabólicas e é importante para o estabelecimento da planta no ambiente. Além disso, a atividade de absorção de nutrientes confere às raízes alta susceptibilidade a estresses ambientais, dentre os quais as substâncias fitotóxicas (Cruz-Ortega *et al.*, 1998).

Considerando o exposto acima, este trabalho pretendeu avaliar as seguintes questões: a) se os fenóis, tanto os presentes no extrato metanólico de folhas de *U. humidicola*, quanto aplicados isoladamente, exerceriam efeito inibitório sobre a germinação e o crescimento inicial de *C. mucunoides*; b) se ocorreram alterações anatômicas em relação à divisão e diferenciação dos tecidos radiculares de *C. mucunoides*, visto que são poucos os estudos anatômicos relacionados com substâncias fitotóxicas (Cruz-Ortega *et al.*, 1998; Chon *et al.*,

2002; Silva, 2012); c) se as substâncias fenólicas do referido extrato metanólico afetariam a ultraestrutura celular em raízes de *C. mucunoides*, com foco principal no complexo de endomembranas, posto que seria a região onde os efeitos fenólicos, em teoria, seriam mais pronunciados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a germinação das sementes e caracterizar a morfoanatomia e a ultraestrutura das raízes de *Calopogonium mucunoides* expostas a substâncias fenólicas do extrato metanólico das folhas de *Urochloa humidicola* e de padrões comerciais, com a finalidade de avaliar o potencial fitotóxico dessas substâncias.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a porcentagem e o índice da germinação das sementes de *C. mucunoides* submetidas aos diferentes tratamentos;
- Avaliar o desenvolvimento inicial dos indivíduos de *C. mucunoides*, através da caracterização da morfologia externa das plântulas e da morfometria; Caracterizar a morfologia interna das raízes;
- Avaliar quantitativamente alterações nas dimensões das regiões anatômicas das raízes;
- Avaliar possíveis alterações ultraestruturais nas células das raízes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de *Urochloa humidicola* e obtenção do extrato foliar

Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com Débora Ramos de Oliveira, aluna de nível Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob orientação do Dr. Mário Geraldo de Carvalho, do Laboratório de Química dos Produtos Naturais, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ.

Os indivíduos de *U. humidicola* foram coletados no campus da UFRRJ, Seropédica, RJ (22°46'59'' S / 43°40'45'' W), em uma pastagem estabelecida há mais de 25 anos. Para obtenção da parte aérea foram realizados cortes a 50 cm acima do solo, durante o estágio vegetativo.

Após a coleta, a parte aérea foi submetida a uma secagem em estufa de circulação forçada de ar (72 h a 45 °C) e triturada em moinho Willey. O pó obtido foi lacrado em saco plástico e mantido sob refrigeração (± 10 °C) até o momento da utilização. O material foi submetido à extração por solução metanol/água (8:2) de forma exaustiva, ou seja, com a retirada do total das substâncias com afinidade pelo solvente, e a frio. O extrato obtido (UHFM) foi submetido a fracionamento por solventes de polaridade crescente, igualmente de forma exaustiva, sucessiva e a frio, passando por hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B), mostrado na Figura 5.

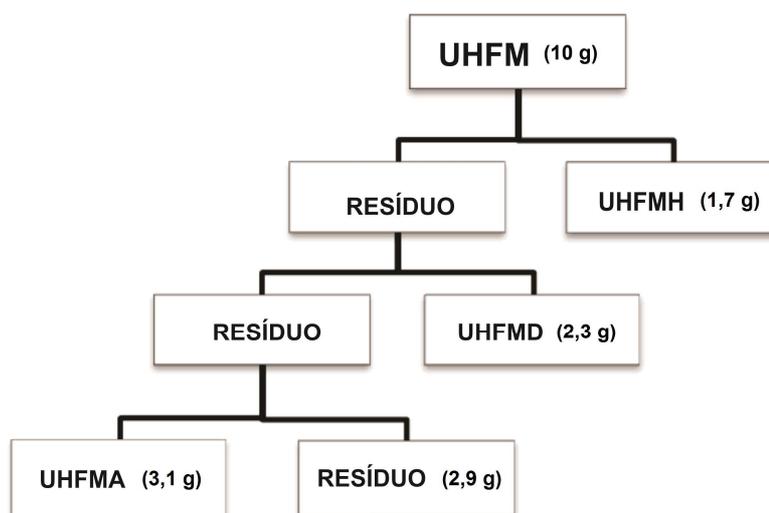


Figura 5: Esquema de fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Urochloa humidicola* (UHFM), utilizando os solventes hexano (UHFMH), diclorometano (UHFMD) e acetato de etila (UHFMA) (Oliveira, 2015).

A fração acetato de etila do extrato metanólico de folhas de *U. humidicola* (UHFMA) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Química dos Produtos Naturais da UFRRJ. Esta fração foi adotada neste trabalho visto que a sua composição havia sido previamente determinada. Na mesma são encontrados o ácido *p*-cumárico, e as flavonas 3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona, 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina) e 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilcanferol (Figura 6).

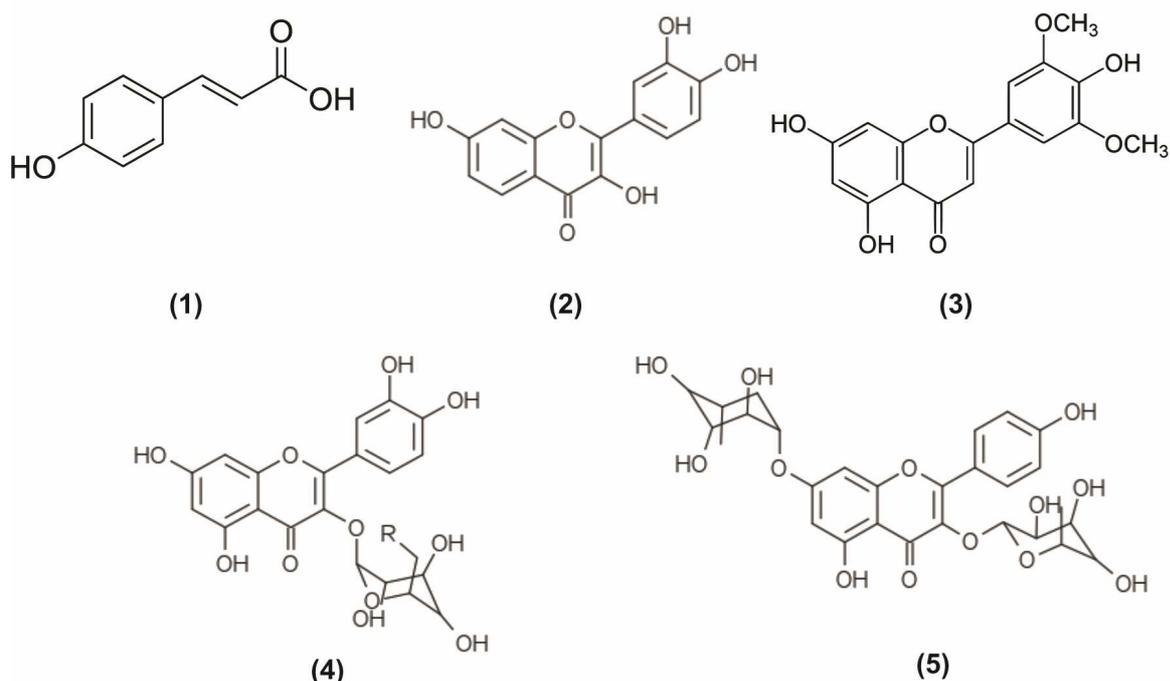


Figura 6: Substâncias encontradas na fração acetato de etila do extrato metanólico de folhas de *Urochloa humidicola* (Oliveira, 2015): ácido *p*-cumárico (1), 3,7,3',4'- tetrahidroxiflavona (2), 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (3), 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona (4), e 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilcanferol (5).

4.2. Bioensaio de atividade fitotóxica

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF, sob colaboração da Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira e do doutorando MSc. Eduardo Alves Gamosa de Oliveira.

As sementes de *C. mucunoides* foram previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% e lavadas por três vezes em água destilada. Foram adotadas triplicatas de 10 sementes por tratamento. Tais sementes foram colocadas em placas de Petri 9 cm descartáveis, com fundo forrado por duas folhas de papel de filtro.

Para a avaliação da fitotoxicidade das folhas de *U. humidicola*, foi utilizado o extrato UHFMA. Para avaliar o efeito das substâncias fenólicas isoladas, foram utilizados padrões comerciais do ácido *p*-cumárico (Figura 6), quercitrina (quercetina-3-ramnosídeo), luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona), fisetina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) e canferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) (Figura 7). As mesmas foram escolhidas por apresentarem semelhança estrutural com os fenóis encontrados nos extratos de *U. humidicola* (Figura 6). Tanto o extrato UHFMA quanto os padrões comerciais supracitados foram dissolvidos inicialmente em DMSO (5 µL por mL de água), e posteriormente adicionada água destilada esterilizada, sendo adotadas três diluições (800, 400 e 200 ppm), sendo mantida a mesma proporção de DMSO para todos os tratamentos. O tratamento controle adotado foi com a água destilada, na qual também foi adicionado DMSO na proporção supracitada.

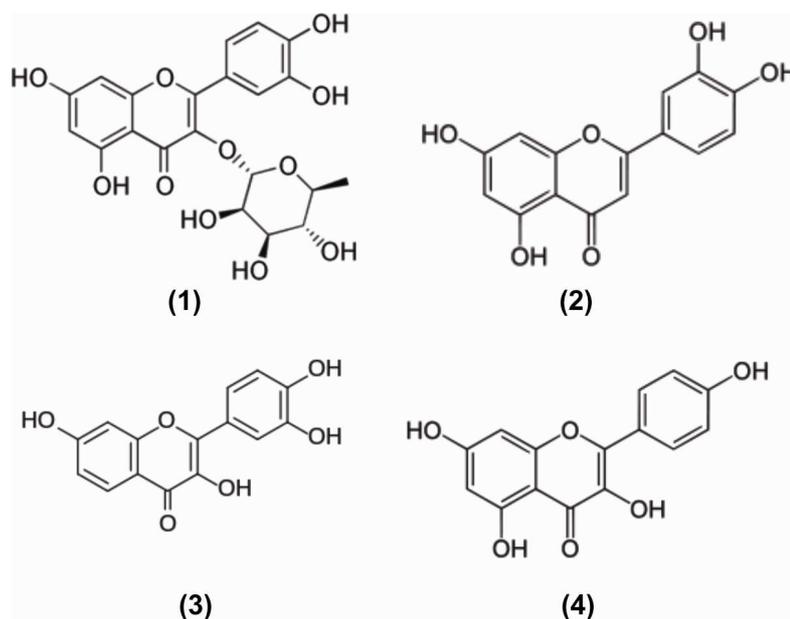


Figura 7: Flavonoides utilizados como tratamentos nos bioensaios: quercitrina (1), luteolina (2), fisetina (3) e canferol (4).

A montagem do bioensaio foi realizada em câmara de fluxo laminar. Para cada placa de Petri foram adicionados 4 ml de água destilada ou de solução referente para cada tratamento. Depois de adicionadas as sementes e as soluções, as placas de Petri foram vedadas com Parafilm e colocadas em câmaras BOD a 25 °C, no escuro, durante 10 dias.

O número de sementes germinadas foi averiguado duas vezes ao dia, considerando germinadas as sementes com extensão radicular igual ou superior a 2,0 mm. Os valores relativos à germinação foram convertidos em porcentagem. Para avaliar se houve inibição da germinação ao longo do tempo, foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação pela

fórmula $IVG = \Sigma(G_n/N_n)$, onde G_n representa o número de sementes germinadas, e N_n o número de dias ou horas após o início do bioensaio (Anjum & Bajwa, 2005).

Mensurações de comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz foram realizadas ao final do experimento (n = 30) através do *plugin* Smart Root 4.1 presente no software Image J (Lobet *et al.*, 2011). Demais observações sobre a morfologia externa também foram avaliadas após 10 dias de tratamento.

4.3. Preparo para microscopia

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF, e no Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ.

Fragmentos das raízes entre 0,1 e 1,0 cm do ápice foram coletados, fixados em solução de glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) por 2 h em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavado no mesmo tampão. Posteriormente, o material foi desidratado em série cetônica: 50%, 70%, 90% e três vezes 100% por 1 h em cada etapa.

4.3.1. Microscopia Óptica

Após o procedimento citado no item 4.3, os fragmentos das raízes foram embebidos e incluídos em resina plástica (Historesin®). Secções transversais foram realizadas através do micrótomo rotatório (1-5 μ m) e posteriormente coradas com azul de toluidina O 1 % e montadas com Entellan® (O'Brien & McCully, 1981). As secções foram observadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS), e documentadas por meio de imagens obtidas pela câmera Cannon Power Shot 14 MP (acoplada ao microscópio), com o auxílio do programa Axiovision (ZEISS).

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a fixação do material, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, também no mesmo tampão durante 1 h em pH 7,2, a temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos foram lavados novamente com o mesmo tampão e desidratados em série cetônica, como descrito em 4.3.

Os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon®), utilizando-se série crescente de resina em acetona, e polimerização a 60 °C durante 48 h. Cortes semifinos (~ 0,60 µm) foram obtidos com o auxílio do ultramicrotomo (Reichert Ultracuts-S®) e faca de diamante (Diatome®), e coletados em grades de cobre de 300 mesh. As secções foram contrastadas com acetato de uranila 5 %, por 40 minutos, e citrato de chumbo, por 5 minutos a temperatura ambiente (Reynolds, 1963). As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão TEM 900 ZEISS, a 80 KV.

4.4. Análises estatísticas

Para a obtenção de dados quantitativos para cada tratamento foram realizadas mensurações do diâmetro total da raiz e do o diâmetro do cilindro central nas secções transversais das raízes (n = 3, 25 medições por indivíduo). Tais valores foram obtidos através de imagens capturadas pela câmera Cannon Power Shot 14 MP (acoplada ao microscópio), com o auxílio do programa Axiovision (ZEISS).

Os dados quantitativos referentes à germinação, ao comprimento total e da raiz, e às mensurações de diâmetro e área das regiões anatômicas das raízes foram utilizados para o cálculo da Porcentagem de Inibição, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%inibição = \left(\frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) 100$$

onde $\bar{X}T$ representa a média do alongamento de cada tratamento, e $\bar{X}C$ a média do alongamento no controle positivo. Os dados são expressos em porcentagem.

Tais dados serão analisados estatisticamente através do software R (R Core Team, 2015). A normalidade das amostras foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) (Shapiro & Wilk, 1965). Para comparação entre os tratamentos nos diferentes parâmetros, foram adotados os seguintes procedimentos: Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$) (Tukey, 1949), para dados paramétricos; e o teste t de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945), para dados não-paramétricos.

5. RESULTADOS

5.1. Germinação de sementes e morfologia externa de indivíduos de *Calopogonium mucunoides* submetidos aos diferentes tratamentos

A Figura 8 mostra o efeito dos diferentes tratamentos sobre a germinação das sementes de *C. mucunoides*, tanto na Porcentagem da Germinação (PG, Figura 8 A), quanto a respeito do Índice de Velocidade da Germinação (IVG, Figura 8 B). Os tratamentos com extratos foliares de *U. humidicola* e com os diferentes padrões comerciais – 200, 400 e 800 ppm -, de um modo geral, não apresentaram valores estatisticamente significativos em relação ao controle, tanto na PG quanto no IVG.

Os indivíduos controle de *C. mucunoides*, após 10 dias de experimento, apresentaram externamente uma coloração branca nas raízes e no caule, além de emissão de raízes laterais na região mediana da raiz (Figura 9 A). Os indivíduos tratados com o extrato de *U. humidicola* não apresentaram alterações na sua morfologia externa quando comparados com o controle (Figura 9 B). Os valores de comprimento da parte aérea e do comprimento total foram significativamente maiores em relação ao controle, nas três diluições no primeiro parâmetro (Figura 8 D) e no segundo, apenas em 200 e 400 ppm (Figura 8 C). Foram observadas raízes menos desenvolvidas nas três concentrações utilizadas (Figura 8 E).

Os indivíduos crescidos na presença de ácido *p*-cumárico a 800 ppm se diferenciaram dos demais tratamentos por apresentarem necrose no ápice radicular, ausência de raízes laterais (Figura 9 C), e os menores valores de comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz, sendo significativamente menores que os indivíduos controle (Figura 8 C-E). Os tratamentos com 200 e 400 ppm do mesmo ácido não apresentaram alterações na sua morfologia externa em comparação com o controle. Foram observados maiores valores de comprimento da parte aérea nos indivíduos tratados com o ácido *p*-cumárico em 200 e 400 ppm, e menores valores de comprimento da raiz em 400 ppm (Figura 8 C-E).

Os indivíduos tratados com os diferentes flavonoides se destacaram pela presença de manchas marrons no ápice e na zona de ramificação das raízes (Figura 9 D-H). No geral, foram observados maiores valores de comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz em comparação ao controle. A Figura 8 (C-E) mostra os efeitos dos flavonoides sobre o comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz, com significância estatística em comparação ao controle.

Os tratamentos com quercitrina (200 e 400 ppm), luteolina (200 e 800 ppm) e fisetina (400 ppm) resultaram em um maior desenvolvimento da plântula, enquanto os demais tratamentos - quercitrina a 800 ppm, fisetina a 200 ppm e canferol a 200 e 400 ppm – causaram redução nos seus valores de comprimento (Figura 8 C). Tais tratamentos tiveram o mesmo efeito sobre a parte aérea dos indivíduos, exceto para o canferol a 200 ppm. Além desses, os indivíduos tratados com luteolina a 400 ppm e canferol a 800 ppm apresentaram maior comprimento da parte aérea (Figura 8 D). Somente os indivíduos crescidos em quercitrina a 200 ppm e em fisetina a 400 e 800 ppm apresentaram raízes mais desenvolvidas, enquanto as plântulas tratadas com canferol, nas três diluições utilizadas, tiveram raízes mais curtas (Figura 8 E).

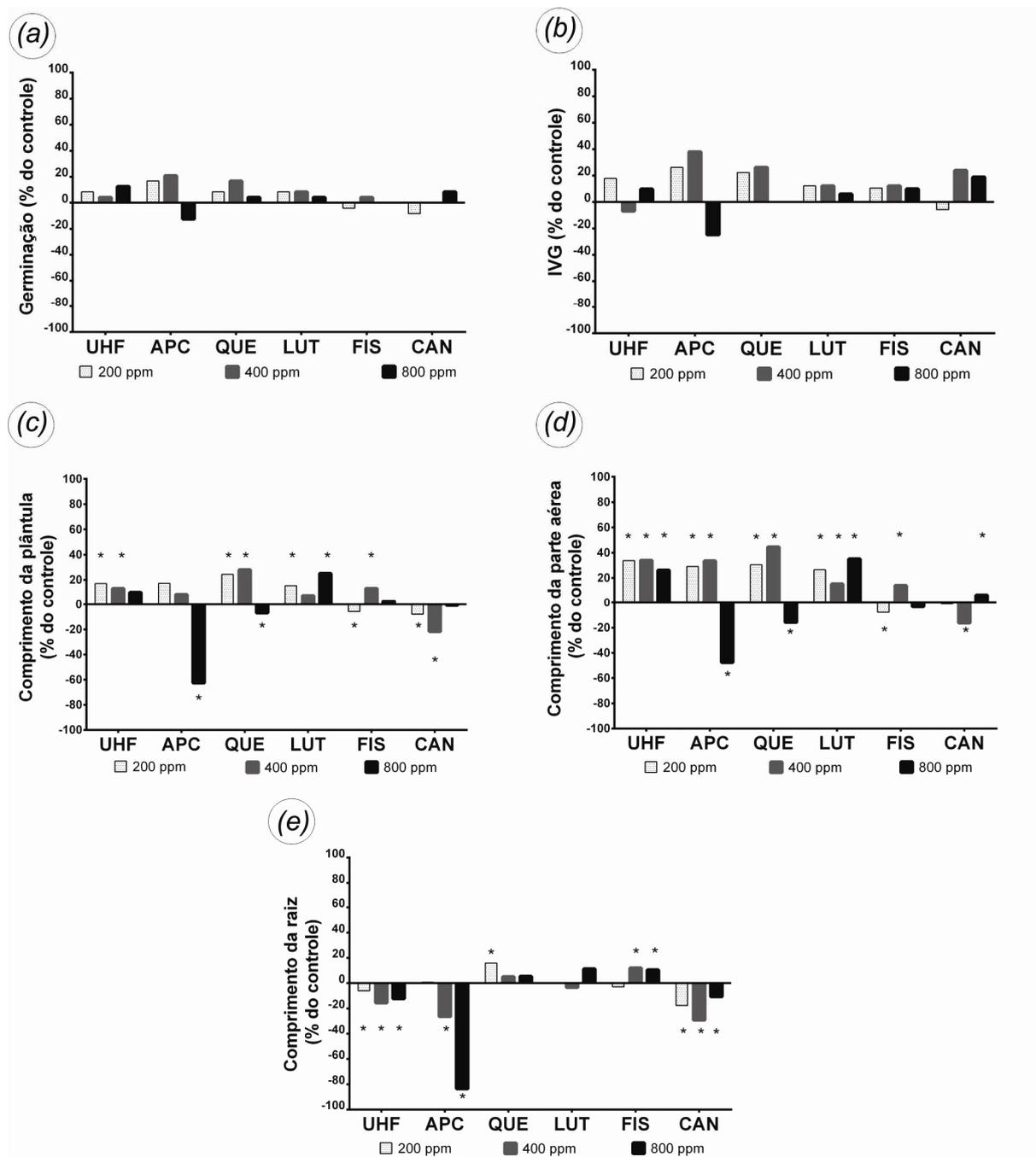


Figura 8: Efeito do extrato metanólico de folhas de *Urochloa humidicola* (UHF), do ácido *p*-cumárico (APC) e dos flavonoides quercitrina (QUE), luteolina (LUT), fisetina (FIS) e canferol (CAN), sob diferentes concentrações (em ppm), na germinação (n=3) e no desenvolvimento inicial (n=30) de *Calopogonium mucunoides*. (a) Porcentagem da Germinação (PG). (b) Índice de Velocidade da Germinação (IVG). (c) Comprimento da plântula. (d) Comprimento da parte aérea. (e) Comprimento da raiz. * Indica diferença significativa em comparação ao controle após realização de Teste t de Wilcoxon ($p < 0,05$).

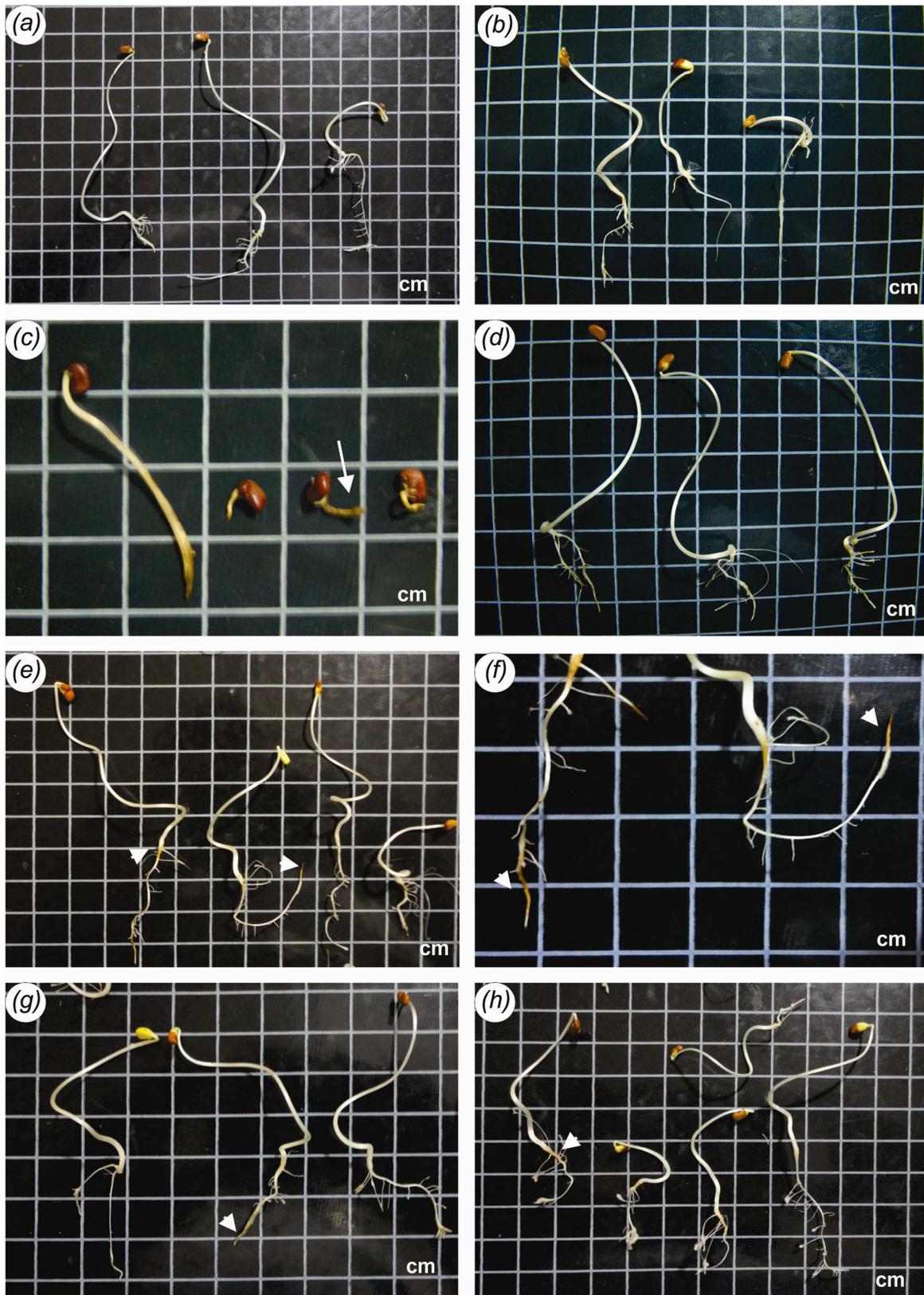


Figura 9: Indivíduos de *Calopogonium mucunoides* após 10 dias sob os diferentes tratamentos. (a) Controle. (b) Extrato metanólico de folhas de *Urochloa humidicola* (800 ppm). (c) Ácido *p*-cumárico (800 ppm); setas indicam necrose. (d) Ácido *p*-cumárico (400 ppm). (e-f) Quercitrina (800 ppm). (e) Aspecto geral. (f) Detalhe das manchas marrons nas raízes. (g) Quercitrina (400 ppm). (h) Fisetina (800 ppm). Pontas de seta indicam manchas marrons nas raízes.

5.2. Anatomia dos indivíduos de *Calopogonium mucunoides* após os diferentes tratamentos

Os indivíduos controle, em seção transversal, a 0,5 cm do ápice (Figura 10 A-B), apresentam a rizoderme unisseriada, com pêlos absorventes. O córtex é formado por uma exoderme uniestratificada, com células poligonais de paredes delgadas, 5-7 camadas celulares de parênquima cortical e endoderme com células dotadas de estrias de Caspary (Figura 10 B). No cilindro central, o periciclo é unisseriado e formado por células parenquimáticas. O xilema é tetrarco, contendo entre 2-4 elementos de vaso em cada pólo. O floema é constituído por pequenos grupos de elementos de tubo crivado, células companheiras e células parenquimáticas.

Nas raízes tratadas com os extratos foliares de *U. humidicola* e com os diferentes flavonoides, nas três concentrações, foram observadas as mesmas características anatômicas descritas para o controle. O tratamento com o extrato da braquiária a 200 ppm apresentou indivíduos com valores de diâmetro da raiz, largura do córtex e diâmetro do cilindro central menores que os de indivíduos controle, enquanto indivíduos tratados com o mesmo extrato a 400 ppm apresentaram diâmetro da raiz e largura do córtex significativamente maiores. Contudo, o tratamento a 800 ppm não teve efeito significativo sobre o diâmetro da raiz ou das suas regiões anatômicas (Figura 11).

Somente os indivíduos tratados com o ácido *p*-cumárico (800 ppm) apresentaram raízes curtas (Figura 8 E). Para esse tratamento, na região de 0,5 cm do ápice, a epiderme não apresenta pelos absorventes, o parênquima cortical apresenta maior número de camadas celulares (aproximadamente 10 camadas). Na endoderme e no periciclo são encontradas células em divisão. O floema se encontra situado externamente ao xilema, e a medula parenquimática se encontra bem desenvolvida, constituindo estrutura caulinar conspícua (Figura 10 C-E). Nessa mesma região, foram observados os maiores valores de diâmetro dentre todos os tratamentos (Figura 11). Os indivíduos tratados com 200 e 400 ppm desse mesmo ácido apresentaram características anatômicas semelhantes às do controle, sendo que o tratamento com 400 ppm apresentou diâmetros da raiz e largura do córtex menores significativamente que o controle (Figura 11 A-B).

Em relação aos tratamentos com os diferentes flavonoides, os mesmos apresentaram características anatômicas semelhantes às descritas para o controle na mesma região. A Figura 11 exibe os resultados das mensurações anatômicas para esses tratamentos. Os indivíduos

tratados com quercitrina 800 ppm, luteolina 200 e 800 ppm, fisetina 200 ppm e canferol 800 ppm apresentaram diâmetro radicular significativamente maiores que o controle (Figura 11 A). Dentre esses tratamentos, a quercitrina 800 ppm e a luteolina 200 ppm também apresentaram maior largura do córtex (Figura 11 B) e a fisetina 200 ppm foi responsável pelo maior diâmetro do cilindro central (Figura 11 C). O tratamento com canferol 800 ppm exibiu maiores valores tanto de largura do córtex como de diâmetro do cilindro central (Figura 11 B-C). Por outro lado, a quercitrina 400 ppm, a fisetina 400 e 800 ppm, e o canferol 200 ppm possuíram valores menores de diâmetro radicular de forma significativa (Figura 11 A), dentre os quais a quercitrina 400 ppm e a fisetina 800 ppm apresentaram menores valores de diâmetro do cilindro central (Figura 11 C). Os indivíduos tratados com canferol 200 ppm apresentaram menor largura do córtex (Figura 11 B), porém o diâmetro do cilindro central foi maior que os dos indivíduos controle (Figura 11 C).

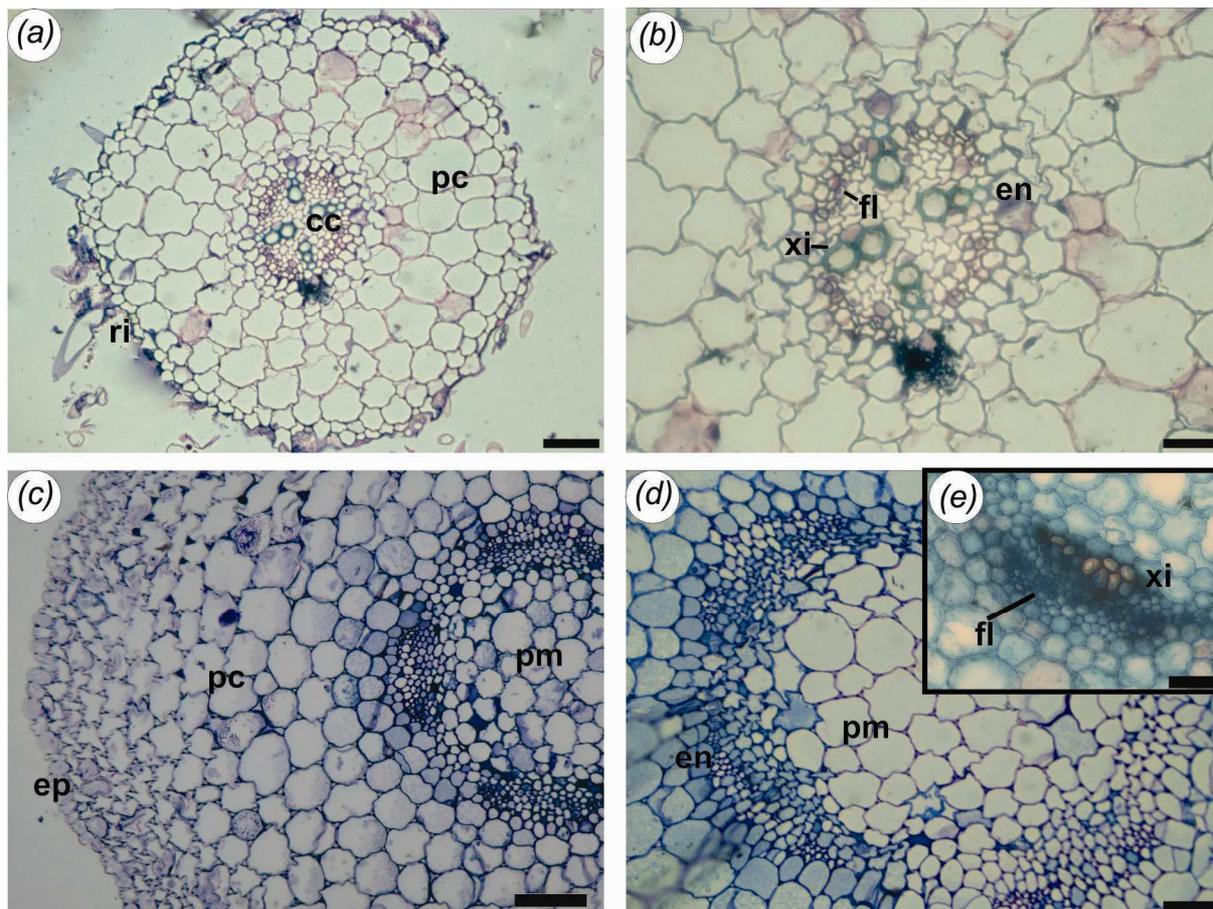


Figura 10: *Calopogonium mucunoides* - 0,5 cm do ápice radicular (S.T.). (a-b) Raiz de indivíduo controle. (a) Aspecto geral. (b) Detalhe do cilindro central. (c-e) Indivíduo tratado ácido p-cumárico (800 ppm). (c) Aspecto geral. (d) Detalhe do cilindro central, com parênquima medular desenvolvido. (e) Detalhe do xilema e do floema. cc = cilindro central; co = córtex; en = endoderme; ep = epiderme; fl = floema; xi = xilema; pc = parênquima cortical; ri = rizoderme. Barras: a, d = 50 μ m; b, e = 25 μ m; c = 100 μ m.

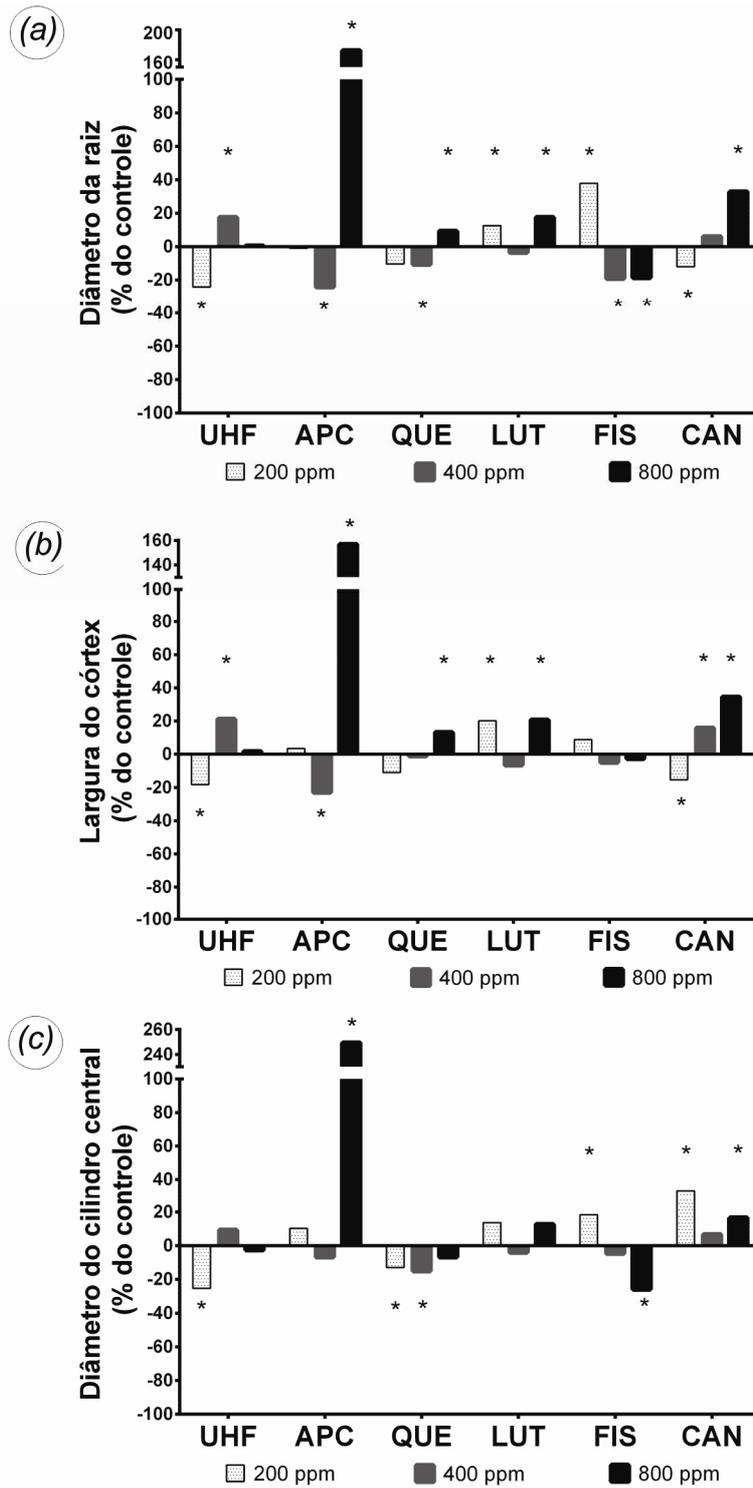


Figura 11: Efeito do extrato metanólico de folhas de *Urochloa humidicola* (UHF), do ácido *p*-cumárico (APC) e dos flavonoides quercitrina (QUE), luteolina (LUT), fisetina (FIS) e canferol (CAN), sob diferentes concentrações (em ppm), nas dimensões anatómicas de *Calopogonium mucunoides* a 0,5 cm do ápice (n=25, r=3). (a) Diâmetro total da raiz. (b) Largura do córtex. (c) Diâmetro do cilindro central. * Indica diferença significativa em comparação ao controle após realização de ANOVA seguida de Teste de Tukey (p < 0,05).

5.3. Ultraestrutura celular em indivíduos de *Calopogonium mucunoides* após tratamento com ácido *p*-cumárico

As análises da ultraestrutura de células controle de *C. mucunoides* na região do cilindro central, a 0,5 cm do ápice da raiz, mostraram células com vacúolo bem desenvolvido e mitocôndrias e núcleo íntegros (Figura 12 A).

As células tratadas com ácido *p*-cumárico a 800 ppm na mesma região apresentaram células bastante alteradas com citoplasma granuloso, degradado e retraído. Neste citoplasma concentram-se depósitos densos osmiofílicos junto à membrana plasmática. As mitocôndrias apresentam-se com cristas inchadas e matriz degradada e o núcleo também é visivelmente degradado (Figura 12 B-E). Tais características foram também descritas para os tratamentos com o mesmo ácido a 400 e 200 ppm (Figura 12 F).

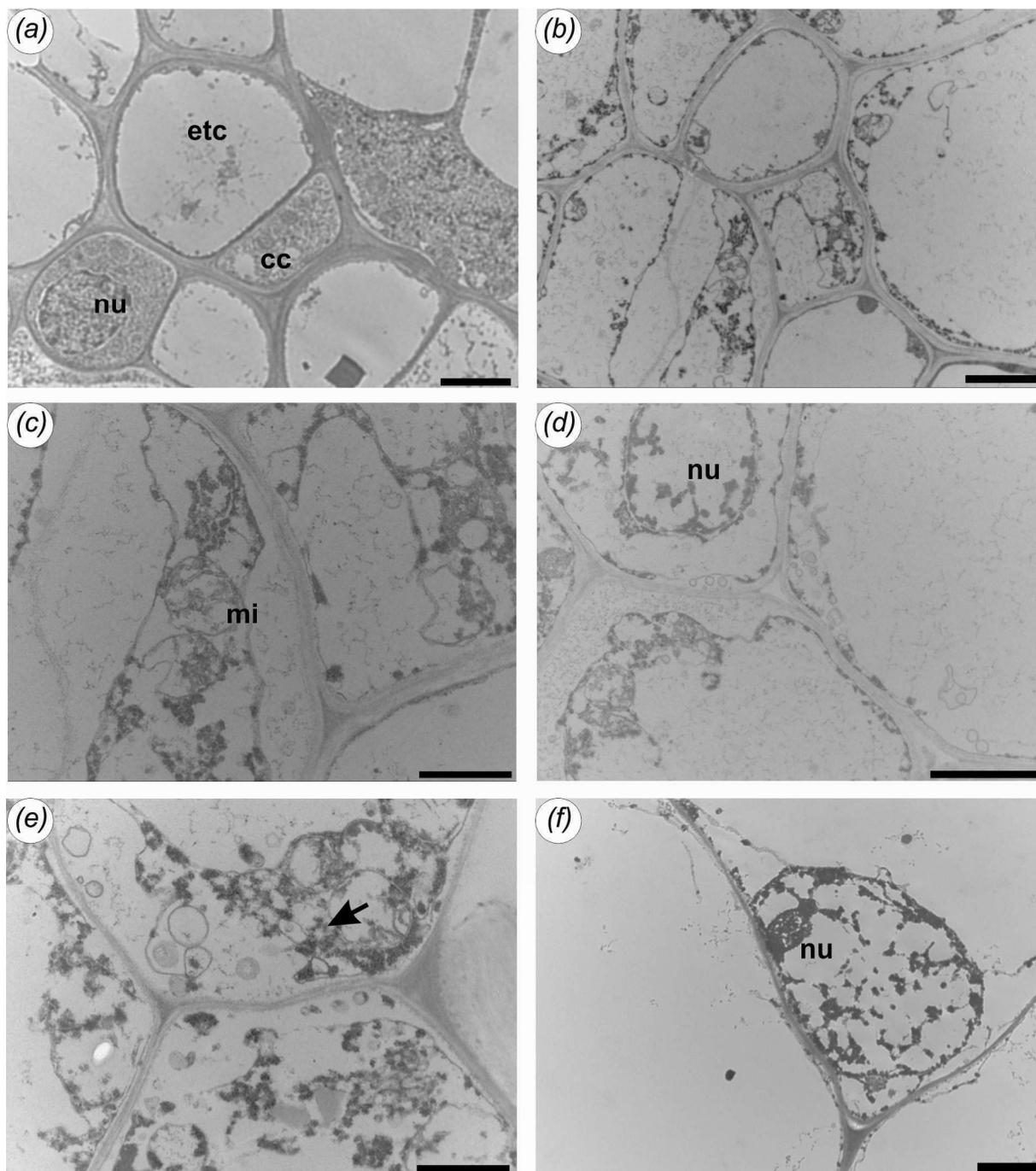


Figura 12: Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) de células de raízes de *Calopogonium mucunoides*, a 0,5 cm do ápice. (a) Controle. Aspecto geral das células do floema. (b-e) Ácido *p*-cumárico 800 ppm. (b) Aspecto geral das células parenquimáticas do cilindro central. (c) Detalhe de uma mitocôndria com cristas inchadas e matriz degradada. (d) Detalhe do núcleo degradado. (e) Acúmulo de depósitos (→). (f) Ácido *p*-cumárico 400 ppm, evidenciando núcleo degradado. Cc = célula companheira, etc = elemento de tubo crivado, mi = mitocôndria, nu = núcleo. Barras: a, b, d, f = 2 μm; c, e = 1 μm.

6. DISCUSSÃO

A partir dos dados analisados neste trabalho foi possível observar que o extrato metanólico de folhas de *U. humidicola* não afetou de forma significativa a germinação das sementes de *C. mucunoides* em nenhuma das concentrações utilizadas – 200, 400 e 800 ppm. Da mesma forma, não foi observada relação direta entre os parâmetros analisados – PG e IVG – e a concentração dos referidos extratos. Além disso, o tratamento com tais extratos não causou alterações evidentes na morfologia externa. Contudo, os valores de comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz apresentaram diferença estatística em comparação com o controle ($P < 0,05$), sendo observados tanto valores superiores ao controle para o comprimento da plântula e da parte aérea, como valores inferiores ao controle para o comprimento da raiz.

Os tratamentos com ácido *p*-cumárico também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois parâmetros – PG e IVG - em relação ao controle. Dentre os ácidos hidroxicinâmicos o ácido *p*-cumárico é considerado um potente inibidor da germinação de sementes (Reigosa *et al.*, 1999). Essa substância fenólica tem sido encontrada em extratos foliares de diferentes espécies vegetais (Fiorentino *et al.*, 2003; Einhellig, 2004; Al Wakeel *et al.*, 2007; Batish *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2011). O ácido *p*-cumárico também está presente em extratos de folhas de *U. mutica* (Chou, 1989) e de *U. brizantha* (Santos *et al.*, 2011). Essa substância foi também identificada em folhas de *U. humidicola* (Souza Filho *et al.*, 2005). Esses autores avaliaram o efeito da mesma na germinação de sementes de malícia (*Mimosa pudica* L.), mata-pasto (*Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby) e fedegoso (*S. occidentalis* (L.) Roxb.), todas espécies daninhas de pastagens, sendo a concentração de 8 mg/L a que apresentou maior percentual de inibição (32,0%) em comparação com o controle. Essa concentração equivale a 8 ppm, sendo 100 vezes menos concentrada que a utilizada neste trabalho, o que mostra alta capacidade inibitória dessa substância fenólica. Embora os resultados observados neste trabalho não corroborem com o descrito na literatura supracitada, é importante ressaltar que diferentes espécies vegetais podem apresentar diferentes respostas ao mesmo tratamento (Macías *et al.*, 2000).

A inibição da germinação por ácido *p*-cumárico também foi observada por Li *et al.* (1993) em sementes de *Lactuca sativa* L. (alface). Baleroni *et al.* (2000) observaram que os tratamentos com os ácidos ferúlico e *p*-cumárico causaram maior acúmulo de lipídios em cotilédones de canola (*Brassica napus* L.) se comparados com os cotilédones não tratados. Os autores atribuem esse aumento no teor lipídico à redução na mobilização de reservas para a

germinação e o desenvolvimento inicial, o que poderia explicar o menor número de sementes germinadas após o tratamento com ácido *p*-cumárico na literatura.

Os flavonoides utilizados neste estudo não apresentaram efeito significativo em relação a PG e IVG. Poucos trabalhos avaliaram os efeitos de flavonoides sobre a germinação de sementes. Cipollini *et al.* (2008) e De Martino *et al.* (2012) observaram que o flavonoide luteolina não exerceu efeito sobre a germinação de sementes, o que também foi observado neste trabalho. Por outro lado, Bais *et al.* (2003) observaram que o canferol inibiu a germinação de diferentes espécies-alvo mesmo em baixas concentrações (50-250 µg/mL, equivalente a 50-250 ppm), diferentemente do observado nos bioensaios.

Ferreira & Áquila (2000) consideram que a germinação é menos sensível às substâncias fitotóxicas em comparação com o desenvolvimento inicial das plântulas. Neste trabalho, os efeitos das substâncias testadas sobre a morfologia e o desenvolvimento inicial de *C. mucunoides* foram mais visíveis que os observados sobre a germinação das sementes.

O tratamento com ácido *p*-cumárico causou redução do comprimento total (800 ppm) e do comprimento radicular (400 e 800 ppm), além de necrose no ápice radicular, observado somente sob concentração a 800 ppm. Souza Filho *et al.* (2005) observaram que o efeito inibitório do ácido *p*-cumárico sobre o desenvolvimento da radícula foi mais evidente que o efeito do mesmo sobre a germinação. A observação de necrose corrobora com Einhellig (2004), que considera comum a ocorrência de raízes curtas e deformadas em plantas tratadas com fenois.

Os ácidos hidroxicinâmicos, dentre os quais os ácidos cinâmico e *p*-cumárico, são descritos na literatura como inibidores potentes do desenvolvimento inicial de plântulas (Einhellig, 2004; Hussain & Reigosa, 2011). Chon *et al.* (2002) observaram que os ácidos cinâmico e *o*-cumárico, além da cumarina, inibiram o desenvolvimento inicial da alfafa (*Medicago sativa* L.), e atribuíram essa observação à inibição da divisão celular. Segundo Souza Filho & Alves (2002), o ácido *p*-cumárico pode afetar o alongamento da radícula e a divisão celular através da redução dos níveis de auxina através de descarboxilação.

O flavonoide glicosilado quercitrina (800 ppm) diminuiu de forma significativa o comprimento da parte aérea, e conseqüentemente o comprimento das plântulas de *C. mucunoides*. Tal efeito foi inverso nas concentrações de 200 e 400 ppm dessa mesma substância. Esse flavonoide foi detectado em folhas de *Eucalyptus globulus* Labill., *Pinus radiata* D. Don e *Acacia melanoxydon* R. Br., espécies vegetais com potencial alelopático (Souto *et al.*, 1994). Embora, diferentes trabalhos ressaltem sua atividade anti-inflamatória e de inibição do estresse oxidativo (Ma *et al.*, 2016; Gómez-Florit *et al.*, 2015), faltavam

estudos sobre possíveis efeitos fitotóxicos. Por outro lado, os tratamentos com luteolina não apresentaram efeito significativo sobre a germinação de *C. mucunoides*, contudo os indivíduos tratados com essa substância apresentaram maiores comprimentos total da plântula e da parte aérea em comparação com o controle. Tais observações não estão de acordo com De Martino *et al.* (2012), que não observaram efeito significativo sobre o desenvolvimento inicial, tanto inibitório como estimulatório.

De um modo geral, os indivíduos tratados com fisetina apresentaram valores de comprimento – da plântula, da parte aérea e das raízes - significativamente maiores que os observados para o controle. A fisetina havia sido previamente detectada nos extratos foliares de *U. humidicola* (Oliveira, 2015), contudo o número de trabalhos sobre a atividade da fisetina é irrisório. Por outro lado, os tratamentos com canferol causaram redução no comprimento da raiz e no comprimento da plântula nas três diluições testadas. O canferol é frequentemente encontrado em espécies vegetais com potencial fitotóxico (ex.: Esposito *et al.*, 2008; Ribeiro, 2012). Esse flavonoide, em associação com quercetina e rutina, inibiu o desenvolvimento inicial de *C. mucunoides* (Ribeiro *et al.*, 2015).

Segundo Stafford (1991), flavonoides contendo o anel B monohidroxilado, como o canferol, estimulam a degradação de auxina, enquanto os que contêm o anel B di-idroxilado, como os demais flavonoides testados, inibem tal etapa. Como a auxina é um fitormônio responsável pela diferenciação da raiz (Aloni *et al.*, 2006), isso ajuda a explicar porque o tratamento com canferol (400 ppm) inibiu de forma significativa o desenvolvimento radicular, o que não ocorreu com os demais flavonoides.

Somente os indivíduos de *C. mucunoides* tratados com ácido *p*-cumárico a 800 ppm apresentaram alterações na morfologia interna em comparação ao controle, tendo apresentado estágio caulinar a 0,5 cm do ápice radicular. Além disso, os indivíduos do mesmo tratamento apresentaram os maiores diâmetros total da raiz e do cilindro central, em comparação com os demais tratamentos, decorrente do desenvolvimento do parênquima medular. Como mencionado anteriormente por Souza Filho & Alves (2002), o ácido *p*-cumárico pode ter causado degradação da auxina, fitormônio relacionado com o desenvolvimento inicial da planta e crescimento da radícula; com o encurtamento da raiz, a região caulinar passa a ocorrer mais próximo ao ápice radicular, como observado neste trabalho. O mesmo já havia sido descrito por Ribeiro *et al.* (2015) em indivíduos de *C. mucunoides* tratados com ácido cinâmico.

Os tratamentos com os diferentes flavonoides, principalmente com concentração de 800 ppm, causaram aumento no diâmetro total da raiz e do cilindro central. Tais resultados

corroboram com o encontrado por Chon *et al.* (2002), que observou raízes de alfafa mais espessas após tratamento com extratos de alfafa e com cumarina. Os autores associaram o aumento em diâmetro com a inibição do crescimento longitudinal, o que foi possível observar somente para os tratamentos com a quercitrina e o canferol. Segundo Cheynier *et al.* (2013), os flavonoides podem inibir o transporte do fitormônio auxina, acarretando no menor desenvolvimento da planta observado nesses tratamentos.

As observações ultraestruturais das células na região do cilindro central das raízes de *C. mucunoides* tratadas com ácido *p*-cumárico mostraram que o sistema de endomembranas, especialmente a mitocôndria e o núcleo, foram visivelmente afetados por este tratamento, além da granulação do citoplasma. Burgos *et al.* (2004) observaram essas características em células de raiz de pepino após o tratamento com as substâncias BOA e DIBOA. Esses autores associaram tal observação com o possível aumento de produção de espécies reativas de oxigênio – EROs -, cujos teores aumentam conforme a planta é exposta às substâncias fenólicas (Ding *et al.*, 2007; García-Sánchez *et al.*, 2012; Sunmonu & Van Staden, 2014). O estresse oxidativo causado pela superprodução de EROs no interior das células pode causar danos nas estruturas membranares, inibição de enzimas relacionadas com a respiração celular, mutações e apoptose em longo prazo (Ye *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007).

. De acordo com Liu *et al.* (2003) e An (2005), os aleloquímicos geralmente ocasionam um efeito positivo em baixas concentrações, ao passo que podem exercer efeito negativo a partir de uma concentração limiar. A inibição do desenvolvimento inicial causada pelo ácido *p*-cumárico 800 ppm, em contraponto com o efeito positivo da mesma substância a 400 e 200 ppm, podem ter apresentado tal padrão de resposta.

No geral, foi possível observar que os tratamentos com os extratos foliares de *U. humidicola* não tiveram efeito significativo na germinação, contudo apresentando efeito positivo sobre o comprimento da plântula, e efeito inibitório sobre o desenvolvimento das raízes de *C. mucunoides*. Entretanto, o ácido *p*-cumárico, isoladamente, exerceu forte influência inibitória em ambos, além de causar alterações significativas em níveis estrutural e ultraestrutural. Considerando que o ácido *p*-cumárico está presente no extrato foliar de *U. humidicola* (Oliveira, 2015), acredita-se que os teores do ácido podem estar baixos no referido extrato, de modo que não poderiam exercer efeito negativo sobre a leguminosa testada. Outra hipótese provável é a ocorrência de interações antagonicas entre o ácido *p*-cumárico e os flavonoides presentes no extrato. A ocorrência de antagonismo entre diferentes substâncias fitotóxicas foi observada por Silva *et al.* (2013) em di-idroflavonois isolados de extratos do timbó (*Derris urucu* (Killip & A.C. Sm.) J.F. Macbr.). Visto que os flavonoides

utilizados nos bioensaios apresentaram efeito inibitório menor no desenvolvimento inicial de *C. mucunoides* em comparação com o observado para o ácido *p*-cumárico 800 ppm, sugere-se que os flavonoides presentes no extrato tenham atuado como antagonistas ao ácido *p*-cumárico, anulando suas propriedades fitotóxicas.

Considerando o exposto acima, existe uma crescente necessidade de buscar maiores informações sobre os efeitos fitotóxicos das substâncias fenólicas encontradas nas folhas de *U. humidicola*. Com o intuito de observar se os efeitos descritos neste trabalho podem se repetir em outras plantas, propõe-se avaliar o efeito de extratos aquosos da braquiária sobre espécies adotadas como padrão em estudos de fitotoxidez, outras espécies de leguminosas utilizadas em consórcios de pastagens e sobre espécies nativas florestais. Sugere-se também a realização de análises anatômicas em diferentes regiões da raiz e do caule da planta-alvo, e de análises qualitativas e/ou quantitativas dos níveis dos fitormônios auxina e citocinina, tendo o intuito de associá-los com o efeito das substâncias fenólicas sobre a estrutura da planta alvo. Por fim, é igualmente interessante a realização de análises em nível fisiológico, para avaliar efeitos sobre a síntese proteica e a produção de EROs.

7. CONCLUSÕES

- O extrato foliar de *Urochloa humidicola* não exerceu efeito inibitorio significativo sobre a germinação de *Calopogonium mucunoides*, contudo apresentou efeito positivo sobre o comprimento da parte aérea, e efeito inibitório sobre o alongamento radicular;
- Os indivíduos tratados com ácido *p*-cumárico, na concentração de 800 ppm, apresentaram raízes curtas, espessas, e com necrose no ápice. Seus indivíduos apresentaram estrutura caulinar a 0,5 cm do ápice, diferentemente dos demais tratamentos;
- O ácido *p*-cumárico, nas três diluições – 200, 400 e 800 ppm -, causou danos nas estruturas membranares e no núcleo de células das raízes de *Calopogonium mucunoides*;
- Os flavonoides quercitrina, luteolina e fisetina apresentaram efeito estimulatório sobre o desenvolvimento inicial de *Calopogonium mucunoides*. O canferol foi o único a apresentar efeito inibitório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WAKEEL, S.A.M.; GABR, M.A.; HAMID, A.A.; ABU-EL-SOUD W.M. Allelopathic effects of *Acacia nilotica* leaf residue on *Pisum sativum* L. *Allelopathy Journal*, v 19, n. 2, p. 411-422, 2007.
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v. 97, n. 5, p. 883-893, 2006.
- ALVES, S.M.; SANTOS, L.S. Natureza química dos agentes alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A.P.S; ALVES, S.M. (Eds.). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002, p. 25-48.
- AN, M. Mathematical modelling of dose-response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. *Nonlinearity in Biology Toxicology, and Medicine*, v. 3, n. 2, p. 153-172, 2005.
- ANJUM, T.; BAJWA, R. Importance of germination indices in interpretation of allelochemical effects. *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 7, n. 3, p. 417-419, 2005.
- BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; KENNAN, A.J.; STERMITZ, F.R.; VIVANCO, J.M. Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 897-901, 2013.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Lipid accumulation during seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biologia Plantarum*, v. 43, n. 2, p. 313-316, 2000.
- BATISH, D.R.; LAVANYA, K.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content and chickpea and pea. *Plant Growth Regulation*, v. 51, n. 2, p. 119-128, 2007.
- BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R.; NADEAU, P. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Canadian Journal of Botany*, v. 75, n. 3, p. 445-450, 1997.

- BERNARDI, A.C.C.; OLIVEIRA, P.P.A.; PRIMAVESI, O. Soil fertility of tropical intensively managed forage system for grazing cattle in Brazil. In: WHALEN, J. K. (Ed.). *Soil fertility improvement and integrated nutrient management: A global perspective*. Rijeka: In Tech Open Access, 2012, p. 37-56.
- BLUM, U.; GERIC, G.M. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 8, p. 1907-1932, 2005.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BUBNA, G.A.; LIMA, R.B.; ZANARDO, D.Y.; DOS SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.; FERRARESE-FILHO, O. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, v. 168, n. 14, p. 1627–1633, 2011.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 3, p. 671-689, 2004.
- CAMARGOS, L.S. *Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em Calopogonium mucunoides em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação*. Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 128f.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 1-20, 2013.
- CHON, S.U; CHOI, S.K.; JUNG, S.; JANG, H.G.; PYO, B.S.; KIM, S.M. Effects of alfafa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. *Crop Protection*, v. 21, n. 10, p. 1077–1082, 2002.
- CHOU, C.H. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. IV. Comparative phytotoxic nature of leachate from four subtropical grasses. *Journal of Chemical Ecology*, v. 15, n. 7, p. 2149-2159, 1989.
- CIPOLLINI, D.; STEVENSON, R.; ENRIGHT, S.; EYLES, A.; BONELLO, P. Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, n. 2, p. 144-152, 2008.

- CIPRIANI, F.A.; KAPLAN, M.A.C.; ISAIAS, R.M.D.; SOARES, G.L.G. Avaliação da fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. *Floresta e Ambiente*, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2014.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 24, n. 12, p. 2039-2057, 1998.
- DANELUZZI, G.S.; SANTOS, V.H.M.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Avaliação dos potenciais fitotóxico e citotóxico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *Bioscience Journal*, v. 30, n. 4, p. 1231-1240, 2014.
- DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n. 9, p. 2079-2094, 2000.
- DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R.P.; DE ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO, V. *In vitro* phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 5, p. 5406-5419, 2012.
- DING, J.; SUN, Y.; XIAO, C.L.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 13, p. 3765-3773, 2007.
- DJURDJEVIC, L.; GAJIC, G.; KOSTIC, O.; JARIC, S.; PAVLOVIC, M.; MITROVIC, M.; PAVLOVIC, P. Seasonal dynamics of allelopathically significant phenolic compounds in globally successful invader *Conyza Canadensis* L. plants and associated sandy soil. *Flora*, v. 207, n. 11, p. 812-820, 2012.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.
- EINHELLIG, F.A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. (Eds.). *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. Boca Ratón: CRC Press, 2004, p. 217-238.
- ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; IZZO, A.; CEFARELLI, G.; GOLINO, A.; MONACO, P. Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of Mediterranean herbaceous plant community. *Journal of Plant Interactions*, v. 3, n. 3, p. 199-210, 2008.

- EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Produção de bovinos em pastagens de *Brachiaria* spp. consorciadas com *Calopogonium mucunoides* nos Cerrados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 27, n. 2, p. 238-245, 1998.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, Edição Especial, p. 175-204, 2000.
- FIORENTINO, A.; GENTILI, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A.; TEMUSSI, F. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 1005-1009, 2003.
- GARCEZ, T.B. *Aspectos metabólicos, nutricionais e produtivos de cultivares de Brachiaria e Panicum visando eficiência no uso do nitrogênio*. Tese de Doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013, 103f.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M.; GARRIDO, I.; CASIMIRO, I.J.; CASERO, P.J.; ESPINOSA, F.; GARCÍA-ROMERA, I.; ARANDA, E. Defense response of tomato seedlings to oxidative stress induced by phenolic compounds from fry olive mill residue. *Chemosphere*, v. 89, n. 6, p. 708-716, 2012.
- GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 27, n. 3B, p. 395-407. 2005.
- GOMAA, N.H.; ABDELGAWAD, H.R. Phytotoxic effects of *Echinochloa colona* (L.) Link. (Poaceae) on the germination and seedling growth of weeds. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 2, p. 492-501, 2012.
- GÓMEZ-FLORIT, M.; MONJO, M.; RAMIS, J.M. Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, v. 5, p. 16593, 2015.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007.
- HEWELT, A.; PRINSEN, E.; SCHELL, J.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. Promoter tagging with a promoterless IPT gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. *Plant Journal*, v. 6, n. 6, p. 879 – 891, 1994.

- HUSSAIN, M.I.; GONZÁLEZ, L.; SOUTO, C.; REIGOSA, M.J. Ecophysiological responses of three native herbs to phytotoxic potential of invasive *Acacia melanoxylon* R. Br. *Agroflorestal Systems*, v. 83, n. 2, p 149-166, 2011.
- HUSSAIN, M.I.; REIGOSA, M.J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C₃ perennial species. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 13, p. 4533-4545, 2011.
- IAS – INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. *Constitution and Bylaw of IAS*. Cádiz: IAS Newsletter, 1996.
- KARIA, C.T. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006, 58 p.
- KATEKAR, G.F.; GEISSLER, A.E. Auxin transport inhibitors. IV. Evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors, the phytotropins. *Plant Physiology*, v. 66, n. 6, p. 1190 – 1195, 1980.
- KICHEL, A.N.; MIRANDA, C.H.B.; ZIMMER, A.H. Degradação de pastagens e produção de bovinos de corte com a integração agricultura X pecuária. In: I Simpósio de Produção de Gado de Corte, 1999, Anais, UFV, Viçosa, p. 201-234, 1999.
- LADHARI, A.; OMEZZINE, F.; DELLAGRECA, M.; ZARRELLI, A.; ZUPPOLINI, S.; HAOUALA, R. Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. *South African Journal of Botany*, v. 88, p. 341-351, 2013.
- LI, H.H.; INOUE, M.; NISHIMURA, H.; MIZUTANI, J.; TSUZUKI, E. Interactions of *trans*-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination in lettuce. *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 8, p. 1775-1787, 1993.
- LI, Z.H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.D.; JIANG, D.A. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, v. 15, p. 8933-8952, 2010.
- LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C. Quimiosistemática micromolecular e tendências evolutivas da superordem Zingiberiflorae (*sensu* Dahlgren). In: KAPLAN, M.A.C.; ABREU, H.S.; LIMA, H.R.P.; SOARES, G.L.G. (Eds.). *Abordagem quimiosistemática e evolução química de fanerógamas*. Seropédica: EDUR-UFRRJ, p. 231-259, 2010.

- LIU, D.L.; AN, M.; JOHNSON, I.R.; LOVETT, J.V. Mathematical modeling of allelopathy. III. A model for curve-fitting allelochemical dose responses. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, v. 1, n. 1, p. 37-50, 2003.
- LOBET, G.; PAGÈS, L.; DRAYE, X. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology*, v. 157, n. 1, p. 29-39, 2011.
- MA, J.Q.; LUO, R.Z.; JIANG, H.X.; LIU, C.M. Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Food Function*, 2016. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/FO/C5FO00913H#!divAbstract>.
- MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, p. 419-426, 2001.
- MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, v. 19, n. 10, p. 16240-16265, 2014.
- MOONEN, A.C.; BÀRBERI, P. An ecological approach to study the physical and chemical effects of rye cover crop residues on *Amaranthus retroflexus*, *Echinochloa crus-galli* and maize. *Annals of Applied Biology*, v. 148, n. 1, p. 73-89, 2005.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para México y America Central. *Darwiniana*, v. 32, n. 1-4, p. 59-75, 1993.
- O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. *The study of plant structure: Principles and selected methods*. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981, 357p.
- OLIVEIRA, D.R. Metabólitos Especiais Isolados de Raízes e Folhas de *Brachiaria humidicola*. Dissertação de Mestrado, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2015, 109p.

- OLIVEIRA, O.C. Parâmetros químicos e biológicos associados com a degradação de pastagens de *Brachiaria* spp. no cerrado brasileiro. Tese de Doutorado, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000, 153p.
- PACIULLO, D.S.C.; AROEIRA, L.J.M.; ALVIM, M.J.; CARVALHO, M.M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 3, p. 421-426, 2003.
- PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; URQUIAGA, G.; GUERRA, J.G.M.; CECON, P.R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2004.
- PERON, A.J.; EVANGELISTA, A.R. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 3, p. 655-661, 2004.
- PINA, G.O. Efeito alelopático do extrato aquoso foliar de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae – cagaita) na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae – gergelim) e *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae – rabanete). Dissertação de Mestrado. Brasília, Universidade de Brasília, 2008, 119f.
- PIZARRO, E.A.; VALLE, C.B. do; KELLER-GREIN, G.; SCHULTZE-KRAFT, R.; ZIMMER, A.H. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical America – Savannas. In: MILES, J.W.; MAAS, B.L.; VALLE, C.B. do (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996, p. 1-15.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International*, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. 2015.
- REIGOSA, M.J.; SOUTO, X.C.; GONZÁLEZ, L. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation*, v. 28, n. 2, p. 83-88, 1999.
- REIGOSA, R.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.

- RIBEIRO, R.C. Considerações sobre a química de *Brachiaria* spp. e efeitos alelopáticos sobre leguminosas tropicais. Tese de Doutorado, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012, 122p.
- RIBEIRO, R.C.; FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; CARVALHO, M.G. Phytotoxic effects of phenolic compounds on *Calopogonium mucunoides* (Fabaceae) roots. *Australian Journal of Botany*, v. 63, n. 8, p. 679-686, 2015.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (Eds.). *Allelopathy: basic and applied aspects*. Londres: Springer, 1992, p. 1-10.
- SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p.531-538, 2008.
- SANTOS, M.D.R.; VITOR, A.P.; CARNEIRO, J.C.; PACIULLO, D.S.C.; MATOS, R.C.; MATOS, M.A.C. Use of ultrasound bath in the extraction and quantification of ester-linked phenolic acids in tropical forages. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2, n. 3, p. 344-351, 2011.
- SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; PACIFICO, S.; MONACO, P.; FIORENTINO, A. Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 4, p. 803-830, 2013.
- SEIFFERT, N.F.; ZIMMER, A.H.; SCHUNKE, R.M.; BEHLING-MIRANDA, C.H. Reciclagem de nitrogênio em pastagem consorciada de *Calopogonium mucunoides* com *Brachiaria decumbens*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 20, n. 5, p. 529-544, 1985.
- SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; VIDHANA ARACHCHI, L.P. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, v. 16, n. 2, p. 207-216, 2010.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.
- SILVA, V.S. Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus* Less. (Asteraceae) nativas no Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Porto Alegre, UFRGS, 2012, 71f.

- SILVA, E.A.S.; LÔBO, L.T.; DA SILVA, G.A.; SOUZA FILHO, A.P.S.; SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, M.S.P. Flavonoids from leaves of *Derris urucu*: assessment of potential effects on seed germination and development of weeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 3, p. 881-889, 2013.
- SOUTO, X.C.; GONZALEZ, L.; REIGOSA, M.J. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (Spain). *Journal of Chemical Ecology*, v. 20, n. 11, p. 3005-3015, 1994.
- 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.). *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 11, n. 3, p. 7-14, 2005.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Mecanismos de Ação dos Agentes Alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A.P.S; ALVES, S.M. (Eds.). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p. 25-48.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.; RODRIGUES, T.D. Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras de pastagens pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. *Pasturas Tropicais*, v. 19, n. 1, p. 45-50, 1997.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Methodologies applied in allelopathic activity evaluation studies in the laboratory: a critical review. *Planta Daninha*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
- STAFFORD, H.A. Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, v. 96, n. 3, p. 680-685, 1991.
- SUNMONU, T.O.; VAN STADEN, J. Phytotoxicity evaluation of six fast-growing tree species in South Africa. *South African Journal of Botany*, v. 90, p. 101-106, 2014.
- TAKAHASHI, L.; SERT, M.A.; KELMER-BRACHT, A.M.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Effects of rutin and quercetin on mitochondrial metabolism and on ATP levels in germinating tissues of *Glycine max*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 36, n. 7, p. 495-501, 1998.

- TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; DITENGOU, F.; PALME, K. Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v. 123, n. 2, p. 130-138, 2005.
- TORRES GONZÁLEZ, A.M.; MORTON, C.M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 37, n. 1, p. 36-44, 2005.
- TUKEY, J. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, v. 5, n. 2, p. 99-114, 1949.
- WERNER, J.C. *Adubação de pastagens*. Nova Odessa, 1984. 49p. (Instituto de Zootecnia. Boletim Técnico, 18).
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 98, n. 18, p. 10487–10492, 2001.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin-Deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulations of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, v. 15, n. 11, p. 2532–2550, 2003.
- WESTON, L.A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 2, p. 283-297, 2013.
- WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, v. 1, n. 6, p. 80-83, 1945.
- YE, S.F.; ZHOU, Y.H.; SUN, Y.; ZOU, L.Y.; YU, J.Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, v. 56, n. 3, p. 255-262, 2006.

ANEXOS

Tabela 1: Efeito dos diferentes tratamentos sobre a Porcentagem da Germinação (PG) e o Índice de Velocidade da Germinação (IVG) das sementes de *Calopogonium mucunoides* (n=3). Os dados estão expostos como média \pm DP. * Indica diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Tratamento		PG (%)	IVG
Controle		80,00 \pm 5,77	1,25 \pm 0,14
Extrato foliar de <i>U. humidicola</i>	200 ppm	86,67 \pm 5,77	1,36 \pm 0,20
	400 ppm	83,33 \pm 5,77	1,26 \pm 0,22
	800 ppm	90,00	1,37 \pm 0,10
Ácido <i>p</i> -cumárico	200 ppm	93,33 \pm 5,77	1,58 \pm 0,14
	400 ppm	96,67 \pm 5,77	1,57 \pm 0,29
	800 ppm	70,00 \pm 17,32	1,14 \pm 0,37
Quercitrina	200 ppm	86,67 \pm 15,27	1,38 \pm 0,33
	400 ppm	93,33 \pm 5,77	1,52 \pm 0,21
	800 ppm	83,33 \pm 5,77	1,23 \pm 0,03
Luteolina	200 ppm	86,66 \pm 11,54	1,45 \pm 0,14
	400 ppm	86,67 \pm 5,77	1,36 \pm 0,21
	800 ppm	83,33 \pm 15,27	1,30 \pm 0,23
Fisetina	200 ppm	76,67 \pm 23,09	1,23 \pm 0,31
	400 ppm	83,33 \pm 5,77	1,43 \pm 0,13
	800 ppm	80,00	1,35 \pm 0,07
Canferol	200 ppm	73,33 \pm 5,77	1,19 \pm 0,11
	400 ppm	80,00 \pm 26,46	1,33 \pm 0,39
	800 ppm	86,67 \pm 15,27	1,42 \pm 0,22

Tabela 2: Efeito dos diferentes tratamentos sobre o desenvolvimento inicial dos indivíduos de *Calopogonium mucunoides* (n=30) após 10 dias sob os diferentes tratamentos. Os dados estão expostos como média \pm DP. * Indica diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Tratamento		Comprimento da plântula (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)
Controle		5,69 \pm 4,25	3,31 \pm 2,57	2,39 \pm 1,85
Extrato foliar de <i>U. humidicola</i>	200 ppm	6,67 \pm 4,26 *	4,42 \pm 2,78 *	2,24 \pm 1,61 *
	400 ppm	6,44 \pm 4,74 *	4,43 \pm 3,26 *	2,01 \pm 1,55 *
	800 ppm	6,27 \pm 18,41	4,17 \pm 2,22 *	2,09 \pm 1,33 *
Ácido <i>p</i> -cumárico	200 ppm	6,67 \pm 2,85	4,27 \pm 1,89 *	2,41 \pm 1,18
	400 ppm	6,17 \pm 3,24	4,41 \pm 2,31 *	1,75 \pm 1,16 *
	800 ppm	2,12 \pm 2,26 *	1,73 \pm 1,86 *	0,39 \pm 0,59 *
Quercitrina	200 ppm	7,08 \pm 4,02 *	4,31 \pm 2,50 *	2,77 \pm 1,91 *
	400 ppm	7,29 \pm 3,38 *	4,78 \pm 2,17 *	2,51 \pm 1,42
	800 ppm	5,30 \pm 3,95 *	2,78 \pm 2,23 *	2,52 \pm 1,95
Luteolina	200 ppm	6,57 \pm 3,91 *	4,18 \pm 2,48 *	2,38 \pm 1,71
	400 ppm	6,12 \pm 3,71	3,81 \pm 2,45 *	2,31 \pm 1,58
	800 ppm	7,13 \pm 3,96 *	4,47 \pm 2,54 *	2,66 \pm 1,69
Fisetina	200 ppm	5,37 \pm 4,25 *	3,05 \pm 2,53 *	2,31 \pm 2,05
	400 ppm	6,45 \pm 4,50 *	3,77 \pm 2,78 *	2,67 \pm 2,01 *
	800 ppm	5,84 \pm 3,71	3,20 \pm 2,18	2,64 \pm 1,83 *
Canferol	200 ppm	5,24 \pm 4,13 *	3,27 \pm 2,82	1,96 \pm 1,57 *
	400 ppm	4,46 \pm 3,33 *	2,77 \pm 2,11 *	1,69 \pm 1,40 *
	800 ppm	5,65 \pm 4,11	3,52 \pm 2,64 *	2,13 \pm 1,72 *

Tabela 3: Efeito dos diferentes tratamentos sobre o diâmetro total, diâmetro do córtex e o diâmetro do cilindro central em indivíduos de *Calopogonium mucunoides* (n=25, r=3) após 10 dias sob os diferentes tratamentos. Os dados estão expostos como média \pm DP. * Indica diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Tratamento		Diâmetro total (μm)	Largura do córtex (μm)	Diâmetro do cilindro central (μm)
Controle		405,38 \pm 29,66	303,92 \pm 16,08	96,44 \pm 13,48
Extrato foliar de <i>U. humidicola</i>	200 ppm	307,51 \pm 37,97 *	248,61 \pm 27,85 *	72,02 \pm 5,55 *
	400 ppm	476,84 \pm 58,76 *	368,17 \pm 54,04 *	105,42 \pm 15,49
	800 ppm	407,84 \pm 18,41	309,19 \pm 13,89	93,91 \pm 10,32
Ácido <i>p</i> -cumárico	200 ppm	401,73 \pm 72,04	314,71 \pm 53,58	106,29 \pm 18,30
	400 ppm	307,57 \pm 21,12 *	233,90 \pm 16,88 *	89,88 \pm 3,27
	800 ppm	1104,60 \pm 89,62 *	780,64 \pm 62,93 *	336,97 \pm 27,97 *
Quercitrina	200 ppm	363,34 \pm 32,82	270,79 \pm 27,72	83,94 \pm 8,60 *
	400 ppm	362,14 \pm 27,11 *	300,63 \pm 13,99	81,98 \pm 7,90 *
	800 ppm	442,91 \pm 14,83 *	344,36 \pm 16,64 *	89,84 \pm 9,88
Luteolina	200 ppm	456,47 \pm 34,59 *	365,30 \pm 37,23 *	109,65 \pm 7,67
	400 ppm	391,25 \pm 27,39	284,05 \pm 19,66	92,53 \pm 12,82
	800 ppm	476,66 \pm 32,49 *	366,90 \pm 28,76 *	108,73 \pm 8,68
Fisetina	200 ppm	558,85 \pm 64,10 *	331,07 \pm 38,07	114,15 \pm 7,11 *
	400 ppm	328,00 \pm 29,81 *	288,83 \pm 45,15	91,87 \pm 7,49
	800 ppm	329,91 \pm 29,80 *	295,86 \pm 61,83	71,43 \pm 6,79 *
Canferol	200 ppm	356,76 \pm 27,23 *	257,17 \pm 23,41 *	128,39 \pm 10,50 *
	400 ppm	430,18 \pm 30,78	352,24 \pm 25,04 *	102,87 \pm 14,72
	800 ppm	538,25 \pm 36,41 *	408,91 \pm 38,02 *	112,40 \pm 19,47 *