

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HENRIQUE VON HERTWIG BITTENCOURT

ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CAPIM-
ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)

TESE

PATO BRANCO

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

HENRIQUE VON HERTWIG BITTENCOURT

**ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CAPIM-
ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

TESE

PATO BRANCO

2017

HENRIQUE VON HERTWIG BITTENCOURT

**ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CAPIM-
ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi

Co-orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2017

B624e Bittencourt, Henrique von Hertwig.
Ecologia da germinação e potencial alelopático de capim-annoni-2
(*Eragrostis plana* Nees) / Henrique von Hertwig Bittencourt. – 2017.
174 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi
Coorientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2017.
Bibliografia: f. 125 – 137

1. Química vegetal. 2. Alelopatia. 3. Ervas daninhas. 4. Fenóis. 5.
Herbicidas – Toxicologia. I. Trezzi, Michelangelo Muzell, orient. II. Teixeira,
Sirlei Dias, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB 9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese nº 028

**ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CAPIM-
ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)**

por

HENRIQUE VON HERTWIG BITTENCOURT

Tese apresentada às 13 horas 30 min. do dia 09 de março de 2017 como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi
Orientador - UTFPR

Dr. Antônio Pedro Souza Filho
Embrapa

Prof. Dr. Jucinei José Comin
UFSC

Prof. Dr. José Abramo Marchese
UTFPR

Profa. Dra. Betânia Brum de Bortolli
UTFPR

Prof. Dr. Moeses Andriago Danner
Coordenador do PPGAG – UTFPR

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa

Dedico, humildemente, a minha querida tia Bettina von Hertwig (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Paulo e Monique e minha esposa Eduarda pelo apoio incondicional e a todos os meus familiares, que relativizaram os momentos de ausência pela necessidade de dedicação a este trabalho.

Ao meu amigo, orientador e professor Michelangelo Muzell Trezzi pelos ensinamentos acadêmicos, pelo carinho, paciência e pela abertura de inúmeras portas. A minha co-orientadora, professora Sirlei Dias Teixeira e ao pesquisador Antônio Pedro Souza Filho pela paciência, pelas inúmeras aulas de química orgânica e pelas colaborações.

Aos professores e técnicos-administrativos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial os professores Ribas Antônio Vidal, José Abramo Marchese e Lindolfo Storck pelos inúmeros ensinamentos e a técnica Gisele Daiane Silveira Borges pela colaboração.

Ao senhor Caetano Pacheco, proprietário da Fazenda Pacheco de Abelardo Luz (SC), que permitindo a realização de coletas de amostras de plantas e de solo na sua unidade de produção, viabilizou a realização do trabalho.

Aos amigos da Universidade Federal da Fronteira Sul, Lisandro Tomas da Silva Bonome, Juliano Cesar Dias e Thiago Bergler Bitencourt pelo incentivo, amizade, ensinamentos e companheirismo.

Ao pessoal da Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial Diego Henrique da Silva, Aline Vargas e a professora Tatiane Luiza Cadorin Oldoni pela colaboração, paciência e ensinamentos.

Aos técnicos laboratoristas da Universidade Federal da Fronteira Sul, em especial Diogo José Siqueira, Vanessa Gomes da Silva e Marcelo Grassi pela colaboração.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial os amigos do Laboratório de Ciência de Plantas Daninhas, Fortunato de Bortoli Pagnoncelli Junior, Eli Danieli Marchesan, Francielli Diesel, Elouize Xavier e Mateus Gallon pela colaboração e companheirismo.

Aos discentes do curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, Edison Ferreira dos Santos Junior, Renan Paganini Valentini, Felix Benedetti, Yasmin Tomazi e Keidima Leite pela colaboração e companheirismo.

“Knowledge is freedom and ignorance is slavery.”

Miles Davis

RESUMO

VON HERTWIG BITTENCOURT, Henrique. Ecologia da germinação e potencial alelopático de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees). 175 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

A invasibilidade do capim-annoni-2 em agroecossistemas tem sido atribuída às suas características biológicas e relações ecológicas. A ecologia da germinação da espécie e a interação alelopática são pouco compreendidas. Este trabalho objetivou determinar a influência de fatores ambientais na germinação, a fitotoxicidade de extratos de capim-annoni-2, identificar e quantificar aleloquímicos fenólicos presentes em suas frações, determinar a influência da degradação da fitomassa e do solo na fitotoxicidade do extrato aquoso, monitorar a degradação dos compostos presentes nos extratos e identificar e quantificar aleloquímicos no solo de área contaminada. Foram realizados experimentos em laboratório utilizando materiais coletados a campo. As sementes germinaram em temperaturas constantes de 15 até 40 °C, mas as percentagens de germinação foram superiores a 94 % apenas em temperaturas alternadas. A exposição à luz aumentou a frequência de plântulas normais. A germinação aumentou com incremento no potencial de água e o número de plantas normais diminuiu com aumento na concentração de cloreto de sódio. A maior taxa de emergência foi observada com as sementes colocadas na superfície do solo, enquanto que nenhuma emergência ocorreu a 4 cm. Foram identificados e quantificados nove compostos fenólicos com potencial aleloquímico nas frações dos extratos de capim-annoni-2: ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, resveratrol e rutina. A ordem decrescente de fitotoxicidade geral dos extratos brutos no desenvolvimento de plântulas de trigo e alfafa foi acetato de etila, metanólico, aquoso e hexânico. Foi identificada correlação inversamente proporcional entre concentração de ácido vanílico e comprimento de radícula e total de plântulas de alfafa. A simulação da degradação da fitomassa e do solo ocasionou aumento na fitotoxicidade dos extratos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas, comprovando a liberação dos aleloquímicos e a influência do solo no aumento de sua fitotoxicidade. Extratos etéreos da fitomassa e do solo incubados apresentaram modificações em seus respectivos cromatogramas do primeiro até o sétimo dia de incubação, enquanto a mistura de fitomassa + solo apresentou maiores modificações apenas entre o primeiro e o terceiro dia de degradação. Foram identificados quatro compostos fenólicos com potencial aleloquímico no solo da área infestada com capim-annoni-2: ácido cumárico, ácido ferúlico, catequina e epicatequina. A concentração destes compostos foi maior na superfície do solo e horizontalmente próximo às plantas de capim-annoni-2, evidenciando associação entre as concentrações dos aleloquímicos com a proximidade da planta.

Palavras-chave: Ecologia fitoquímica. Plantas daninhas. Compostos fenólicos. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

VON HERTWIG BITTENCOURT, Henrique. Ecology of germination and allelopathic potential of South African lovegrass (*Eragrostis plana* Nees). 175 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Plant science), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2017.

The invasiveness of South African lovegrass in agroecosystems has been attributed to its biological characteristics and the ecological relations. The ecology of species germination and allelopathic interaction are poorly understood. The objective of this work was to determine the influence of environmental factors on germination, phytotoxicity of South African lovegrass extracts, to identify and quantify phenolic allelochemicals present in their fractions, to determine the influence of phytomass and soil degradation on the phytotoxicity of the aqueous extract, to monitor the degradation of the compounds present in the extracts and to identify and quantify allelochemicals in a infested soil. Experiments were carried out in the laboratory using materials collected in the field. Seeds germinated at constant temperatures of 15 to 40 ° C, but the percentages of germination were greater than 94 % only at alternating temperatures. Exposure to light increased the frequency of normal seedlings. Germination increased with increasing water potential and the number of normal plants decreased with increasing sodium chloride concentration. The highest emergence rate was observed with the seeds placed on the soil surface, whereas no emergence occurred at 4 cm. A total of nine phenolic compounds with allelochemical potential were identified in the fractions of extracts of South African lovegrass: caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, vanillic acid, catechin, epicatechin, resveratrol and rutin. The general decreasing order of general phytotoxicity of crude extracts in the development of wheat and alfalfa seedlings was ethyl, methanolic, aqueous and hexane acetate. An inversely proportional correlation was identified between vanillic acid concentration and root and total alfalfa seedlings length. The simulation of phytomass and soil degradation caused an increase in the phytotoxicity of the extracts on germination and seedling development, proving the release of the allelochemicals and the influence of the soil in the increase of its phytotoxicity. The ether extracts of the straw and soil showed changes in their chromatograms from the first to the seventh day of incubation, while the mixture of straw + soil showed greater changes only between the first and third day of degradation. Four phenolic compounds with allelochemical potential were identified in the South African lovegrass infested soil: coumaric acid, ferulic acid, catechin and epicatechin. The concentration of these compounds was higher at the soil surface and horizontally near the South African lovegrass plants, showing an association between concentrations of allelochemicals and plant distance.

Keywords: Phytochemical ecology. Weeds. Phenolic compounds. Phytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) em área de pastagem infestada no município de Abelardo Luz (SC). Fonte: do Autor, 2015. 1
- Figura 2.1 – Diagrama esquemático simplificado dos mecanismos envolvidos na transformação, transporte, degradação e disponibilização de aleloquímicos para absorção por plantas alvo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 12
- Figura 2.2 – Reprodução de nota de divulgação do capim-annoni-2 na seção “Suplemento Rural” de jornal do Rio Grande do Sul na década de 1970. Fonte: Vinícius Machado, 2015. 16
- Figura 2.3 – Estrutura química do fenol, o mais simples composto fenólico, com os respectivos constituintes que caracterizam a classe química dos fenólicos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 18
- Figura 2.4 – Exemplos de estruturas químicas de fenilpropanóide (Ácido caféico) C_6-C_3 e de acetato-fenilpropanóide (Quercetina) $C_6-C_3-C_6$. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 19
- Figura 2.5 – Visão geral das vias de biossíntese, compostos intermediários e enzimas envolvidas na produção da maioria dos compostos fenólicos. Adaptado de Kutchan et al. (2015). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 20
- Figura 3.1 – Efeito de temperaturas contínuas em quatro variáveis de sementes de *Eragrostis plana* avaliadas no 14º dia após a semeadura. A – A curva representa um modelo Gaussiano, onde Y é a germinação (%) em determinada temperatura (°C) X. B – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é semente quiescente (%) em determinada temperatura (°C) X. C – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é a mortalidade (%) em determinada temperatura (°C) X. D – A curva representa um modelo Gaussiano não-linear, onde Y é o índice de velocidade de germinação (IVG) em determinada temperatura (°C) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 34
- Figura 3.2 – Distribuição do total de sementes germinadas de *Eragrostis plana* na temperatura de alternada de 35/20 °C até o sétimo dia após a semeadura. A curva representa um modelo Gaussiano, onde Y é o total de sementes germinadas (%) em um certo tempo (dias) X. Os pontos representam as médias de quatro repetições com a barra representando os respectivos erros padrões. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 36
- Figura 3.3 – Germinação de sementes de *Eragrostis plana* em resposta a diferentes potenciais osmóticos no sétimo dia após a semeadura. A curva representa um polinomial de segunda ordem, onde Y é o total de sementes germinadas (%) em determinado potencial osmótico (MPa) X. Os pontos representam as médias de quatro repetições com a barra representando os respectivos erros padrões. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 38
- Figura 3.4 – Efeito da salinidade (concentração de NaCl) em quatro variáveis de sementes de *Eragrostis plana* no 7º dia após a semeadura em temperatura alternada (35/20 °C). A – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é a germinação (%) em determinada salinidade (mM) X. B – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é plântulas normais (%) em determinada salinidade (mM) X. C – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é plântulas anormais (%) em determinada salinidade (mM) X. D – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é a semente quiescente (%) em determinada salinidade (mM) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 40
- Figura 3.5 – Emergência cumulativa de *Eragrostis plana* em temperatura alternada (35/20 °C) em diferentes profundidades de enterrio das sementes (0, 1, 2 e 3 cm) até o 12º dia após a semeadura. As curvas correspondem a modelos não lineares de Weibull, onde Y é a emergência de plântulas (%) em um certo tempo (dias) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 42
- Figura 3.6 – Emergência de *Eragrostis plana* em temperatura alternada (35/20 °C) em diferentes profundidades de enterrio das sementes (0, 1, 2, 3 e 4 cm) no 12º dia após a semeadura. A curva corresponde ao modelo polinomial de primeira ordem, onde Y é a emergência de plântulas (%) em

| | |
|---|----|
| determinada profundidade (cm) X. Pontos representas as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 43 |
| Figura 4.1 – Diferença percentual no comprimento de radícula de plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e trigo (<i>Triticum aestivum</i>), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 53 |
| Figura 4.2 – Diferença percentual no comprimento de hipocótilo de plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e trigo (<i>Triticum aestivum</i>), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 54 |
| Figura 4.3 – Diferença percentual no comprimento total de plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e trigo (<i>Triticum aestivum</i>), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 55 |
| Figura 4.4 – Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto hexânico da parte aérea de capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 56 |
| Figura 4.5 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto acetato de etila da parte aérea de capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 57 |
| Figura 4.6 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto metanólico da parte aérea de capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 59 |
| Figura 4.7 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto aquoso da parte aérea de capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 60 |
| Figura 5.1 – Percentagem de germinação acumulada de alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem as médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 75 |
| Figura 5.2 – Percentagem de germinação acumulada de braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem as médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 76 |
| Figura 5.3 – Percentagem de germinação acumulada de trigo (<i>Triticum aestivum</i> cv. IPR Catuara) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem as médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 77 |
| Figura 5.4 – Diferença de percentual de ocorrência de plântulas normais, anormais, sementes quiescentes, mortalidade e índice de velocidade de germinação entre o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de fitomassa degradada deannoni e a testemunha com água destilada para alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca), braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) e trigo | |

(*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) no 9º, 12º e 7º dia após a semeadura, respectivamente. As barras correspondem a diferença média em percentagem entre os valores observados no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de *annoni* e no tratamento controle com água destilada com as barras de erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 79

Figura 5.5 – Diferença percentual dos comprimentos de radícula, de hipocótilo e total e massa de plântulas entre o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-*annoni* e a testemunha com água destilada para alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) 48 horas após a incubação. As barras correspondem a diferença média em percentagem entre os valores observados no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de *annoni* e no tratamento controle com água destilada com as barras de erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 81

Figura 6.1 – Comprimento da radícula de plântulas de trigo nos tratamentos com extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) em diferentes períodos de degradação (dias) em relação a testemunha com água destilada. Os pontos representam as médias dos tratamentos e o erro padrão a variabilidade entre as repetições. A curva em (C) representa modelo polinomial de segunda ordem; onde Y é o comprimento da radícula em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 93

Figura 6.2 – Comprimento de hipocótilo de plântulas de trigo nos tratamentos com extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) em diferentes períodos de degradação (dias) em relação a testemunha com água destilada. Os pontos representam as médias dos tratamentos e o erro padrão a variabilidade entre as repetições. A curva em (C) representa modelo polinomial de segunda ordem; onde Y é o comprimento do hipocótilo em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 95

Figura 6.3 – Concentração de fenóis totais (mg.L^{-1}) no extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) do primeiro ao vigésimo primeiro dia de degradação. As curvas representam modelos polinomiais de segunda ordem; onde Y é a concentração de fenóis totais (mg.L^{-1}) em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 99

Figura 6.4 – Cromatogramas dos extratos etéreos da fitomassa degradada de capim-*annoni*-2 (*Eragrostis plana*) em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 102

Figura 6.5 – Cromatogramas dos extratos etéreos da fitomassa degradada de capim-*annoni*-2 (*Eragrostis plana*) com solo em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 103

Figura 6.6 – Cromatogramas dos extratos etéreos do solo degradado em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 104

Figura 7.1 – Exemplificação da amostragem estratificada de solo para determinação de fitotoxicidade da solução do solo e quantificação espacial de compostos fenólicos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. 110

Figura 7.2 – Estruturas bidimensionais de compostos fenólicos (A - Catequina; B - Epicatequina; C - Ácido cumárico, e; D - Ácido ferúlico) identificados na solução do solo de área contaminada por capim-*annoni*-2 (*Eragrostis plana*) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 113

Figura 7.3 – Distribuição espacial no perfil do solo à partir da planta de capim-*annoni*-2 (cm) da concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) A – Catequina ($R^2 = 61\%$); B – Epicatequina ($R^2 = 86\%$); C - Ácido cumárico ($R^2 = 54\%$), e; D - Ácido ferúlico ($R^2 = 80\%$). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 115

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1. Peso molecular, densidade, coeficiente de partição octanol água, capacidade de dissociação eletrolítica e solubilidade em água de alguns aleloquímicos da classe dos compostos fenólicos com propriedades alelopáticas. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 14 |
| Tabela 3.1 – Influência das temperaturas alternadas nas plântulas normais e anormais, sementes quiescentes e mortas e no índice de velocidade de germinação de <i>Eragrostis plana</i> no sétimo dia após a semeadura. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 36 |
| Tabela 3.2 – Influência da exposição a luz sobre plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas de <i>Eragrostis plana</i> no sétimo dia após a semeadura. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 37 |
| Tabela 3.3 – Influência de nove dias de restrição hídrica sobre a percentagem de plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas de <i>Eragrostis plana</i> no sétimo dia após a ressemeadura. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 39 |
| Tabela 4.1 – Gradiente de concentração de solventes da fase móvel utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da mistura B (água, ácido acético e acetonitrila - 58:2:40) em relação a A (água e ácido acético - 98:2) no tempo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 50 |
| Tabela 4.2 – Comprimento de radícula, de hipocótilo e total (mm) de plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e trigo (<i>Triticum aestivum</i>) incubados com diferentes extratos brutos de parte aérea de capim - annoni-2 em concentração de 1 % (v/v) por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 51 |
| Tabela 4.3 – Concentrações de compostos fenólicos identificados nas amostras de extratos brutos hexânico, acetato de etila, metanólico, aquoso e total determinadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria seca da parte aérea do capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 62 |
| Tabela 4.4 – Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as concentrações dos compostos fenólicos identificados nos extratos brutos e o comprimento de radícula, hipocótilo e total de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e trigo (<i>Triticum aestivum</i>). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 64 |
| Tabela 5.1 – Características físico-químicas do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni e da água destilada. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 71 |
| Tabela 5.2 – Tempo necessário em dias para que alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca), braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) e trigo (<i>Triticum aestivum</i> cv. IPR Catuara) atingisse 50% da germinação máxima (t_{50}) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 77 |
| Tabela 5.3 – Percentagem de plântulas normais, anormais, sementes quiescentes e mortalidade em alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca), braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) e trigo (<i>Triticum aestivum</i> cv. IPR Catuara) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni no 9°, 12° e 7° dia após a semeadura, respectivamente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 78 |
| Tabela 5.4 – Comprimentos de radícula, de hipocótilo e total e massa de plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca), braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) e trigo (<i>Triticum aestivum</i> cv. IPR Catuara) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni 48 horas após a incubação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 80 |
| Tabela 5.5 – Influência negativa (-), neutra (0) ou positiva (+) do extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 degradada por 10 dias sobre diferentes variáveis de sementes e plântulas de alfafa (<i>Medicago sativa</i> cv. Monarca), braquiária brizanta (<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu) e trigo (<i>Triticum aestivum</i> cv. IPR Catuara) comparativamente a testemunha com água destilada. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. | 82 |
| Tabela 6.1. Valores de pH e de condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) dos extratos de fitomassa, fitomassa + solo e solo em diferentes períodos de incubação (dias) em temperatura ambiente (~25 °C). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. | 97 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 7.1 – Gradiente de concentração de solventes da fase móvel utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da mistura B (água, ácido acético e acetonitrila - 58:2:40) em relação a A (água e ácido acético - 98:2) no tempo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 111 |
| Tabela 7.2. Frequência relativa dos compostos fenólicos (%) catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico na solução do solo de área infestada com capim-annoni-2 e em área não infestada (testemunha). Os valores correspondem a média. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 113 |
| Tabela 7.3. Concentrações dos compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico nos extratos da solução do solo em diferentes posições no perfil de área infestada com capim-annoni-2 e em área não infestada (testemunha). Os valores correspondem a média \pm erro padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016..... | 114 |

LISTA DE SIGLAS, ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| a.C. | Antes de Cristo |
| Anova | Análise de variância |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BOD | Biochemical Oxygen Demand - Demanda Bioquímica do Oxigênio |
| CCDC | Cromatografia em Camada Delgada Comparativa |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CTC | Capacidade de troca de cátions |
| DIC | Delineamento Inteiramente Casualizado |
| DMS | Diferença Mínima Significativa |
| Embrapa | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| IPR | Cultivar desenvolvida pelo Instituto Agrônômico do Paraná |
| N/A | Não aplicável |
| PAL | Fenilalanina Amônia Liase |
| PA | Para Análise |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PPM | Partes por milhão |
| PR | Unidade da Federação – Paraná |
| RS | Unidade da Federação – Rio Grande do Sul |
| rpm | Revoluções por minuto |
| SC | Unidade da Federação – Santa Catarina |
| UFFS | Universidade Federal da Fronteira Sul |
| UTFPR | Universidade Tecnológica Federal do Paraná |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|--|
| ψ_s | Potencial osmótico |
| % | Porcentagem |
| °C | Grau Celsius |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μmol | Micromol |
| ® | Marca oficialmente registrada no <i>US Patent & Trademark Office</i> |
| 4CL | 4-Cumarato-CoA Ligase |
| C:N | Relação carbono-nitrogênio |
| C4H | Trans-cinamato 4 Mono-oxigenase |
| cm | Centímetro |
| dm | Decímetro |
| g | Gramas para massa ou força gravitacional para centrifugação |
| t_{50} | Tempo necessário para expressão de 50 % da germinação máxima |
| kg | Quilograma |
| km | Quilômetro |
| Kow | Coefficiente de partição octanol e água |
| L | Litro |
| M | Molar |
| MEP | 2-C-methyl-d-eritritol 4-fosfato |
| mM | Milimolar |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MPa | Megapascal |
| nm | Nanômetro |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| n° | Número |
| p | Probabilidade |
| pKa | Capacidade de dissociação eletrolítica |
| r | Coefficiente de correlação de Pearson |
| R\$ | Real brasileiro |
| R^2 | Coefficiente de determinação |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1.1 ESTRUTURA DA TESE | 4 |
| 1.2 OBJETIVOS | 6 |
| 1.2.1 Objetivo geral | 6 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 6 |
| 1.3 HIPÓTESES | 6 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 8 |
| 2.1 INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS | 8 |
| 2.1.1 Liberação de aleloquímicos no meio | 10 |
| 2.1.2 Comportamento de aleloquímicos no solo | 11 |
| 2.2 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS DO CAPIM-ANNONI-2 | 14 |
| 2.3 INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENVOLVENDO O CAPIM-ANNONI-2 | 17 |
| 2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS | 18 |
| 2.4.1 Biossíntese de compostos fenólicos | 19 |
| 2.4.2 Comportamento de compostos fenólicos no solo | 20 |
| 2.4.3 Mecanismos de ação de compostos fenólicos | 22 |
| 3 ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E EMERGÊNCIA DE CAPIM-ANNONI-2 | 27 |
| RESUMO | 27 |
| ABSTRACT | 27 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 28 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.2.1 Coleta e preparação de semente | 29 |
| 3.2.2 Efeito de temperaturas contínuas na germinação | 30 |
| 3.2.3 Efeito de temperaturas alternadas na germinação | 31 |
| 3.2.4 Efeito da exposição a luz na germinação | 31 |
| 3.2.5 Efeito da disponibilidade de água na germinação | 32 |
| 3.2.6 Efeito da salinidade na germinação | 32 |
| 3.2.7 Efeito da profundidade de enterrio da semente na emergência da plântula | 33 |
| 3.2.8 Análise estatística | 33 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 3.3.1 Efeito da temperatura constante na germinação | 33 |
| 3.3.2 Efeito de temperaturas alternadas na germinação | 35 |
| 3.3.3 Efeito da exposição a luz na germinação | 37 |
| 3.3.4 Efeito da disponibilidade hídrica na germinação | 38 |
| 3.3.5 Efeito da salinidade na germinação | 39 |
| 3.3.6 Efeito da profundidade de semeadura na emergência de plântulas | 41 |
| 3.4 CONCLUSÕES | 44 |
| 4 FITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DO CAPIM-ANNONI-2 E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS | 45 |
| RESUMO | 45 |
| ABSTRACT | 45 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 4.2.1 Extração sólido-líquido..... | 48 |
| 4.2.2 Bioensaios para determinação de fitotoxicidade..... | 49 |
| 4.2.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos brutos | 50 |
| 4.2.4 Análise estatística | 51 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4.3.1 Ensaio de fitotoxicidade dos extratos brutos..... | 51 |
| 4.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos brutos | 55 |
| 4.3.3 Relações entre fitotoxicidade e concentrações de compostos fenólicos | 63 |
| 4.4 CONCLUSÕES..... | 65 |
| 5 FITOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DA FITOMASSA DEGRADADA DE CAPIM-ANNONI-2 E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS | 66 |
| RESUMO | 66 |
| ABSTRACT..... | 66 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 67 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 5.2.1 Obtenção do extrato aquoso da fitomassa incubada | 70 |
| 5.2.2 Quantificação de fenóis totais | 71 |
| 5.2.3 Bioensaio de germinação | 72 |
| 5.2.4 Bioensaio de desenvolvimento de plântulas | 73 |
| 5.2.5 Análise estatística | 74 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 74 |
| 5.3.1 Quantificação dos fenóis totais no extrato aquoso da fitomassa degradada ... | 74 |
| 5.3.2 Influência do extrato aquoso da fitomassa degradada na germinação | 75 |
| 5.3.1 Influência do extrato aquoso da fitomassa degradada no desenvolvimento de plântulas | 80 |
| 5.3.2 Síntese da influência do extrato sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas | 82 |
| 5.4 CONCLUSÕES..... | 84 |
| 6 INFLUÊNCIA DE PERÍODOS DE DEGRADAÇÃO NA FITOTOXICIDADE DA FITOMASSA DE CAPIM-ANNONI-2 E MONITORAMENTO DA DINÂMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS..... | 85 |
| RESUMO | 85 |
| ABSTRACT..... | 85 |
| 6.1 INTRODUÇÃO..... | 86 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 88 |
| 6.2.1 Preparação do material para a simulação de degradação..... | 88 |
| 6.2.2 Obtenção do extrato aquoso do material degradado | 89 |
| 6.2.3 Bioensaio de fitotoxicidade | 89 |
| 6.2.4 Determinação do pH, da condutividade elétrica e de fenóis totais | 90 |
| 6.2.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato da fitomassa degradada..... | 91 |
| 6.2.6 Análise estatística | 92 |
| 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 92 |
| 6.3.1 Efeito do extrato aquoso no comprimento de radícula..... | 92 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.2 Efeito do extrato aquoso no comprimento de hipocótilo | 94 |
| 6.3.3 pH e condutividade elétrica..... | 96 |
| 6.3.4 Fenóis totais | 98 |
| 6.3.5 Perfis cromatográficos dos extratos..... | 101 |
| 6.4 CONCLUSÕES..... | 105 |
| 7 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM POTENCIAL ALELOPÁTICO EM SOLO INFESTADO POR CAPIM-ANNONI-2 | 106 |
| RESUMO | 106 |
| ABSTRACT..... | 106 |
| 7.1 INTRODUÇÃO..... | 107 |
| 7.2 MATERIAL E MÉTODOS | 109 |
| 7.2.1 Amostragem de solo, preparação e extração de compostos fenólicos | 109 |
| 7.2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos | 111 |
| 7.2.3 Análise estatística | 112 |
| 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 112 |
| 7.4 CONCLUSÕES..... | 119 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 120 |
| REFERÊNCIAS | 125 |
| VITA..... | 138 |
| ANEXOS..... | 139 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A planta *Eragrostis plana* Nees (Figura 1.1) é uma espécie da família Poaceae de ciclo de vida perene estival de verão, alóctone, que se reproduz por sementes. Além do Brasil, ela também foi introduzida em outras partes do mundo, tendo sido registrada na Bélgica (VERLOOVE, 2006), Nova Zelândia (HOWELL; SAWYER, 2006), Estados Unidos (USDA, 2015), Reino Unido (RYVES; CLEMENT; FOSTER, 1996), Uruguai e Argentina (MEDEIROS; FOCHT, 2007).



Figura 1.1 – Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) em área de pastagem infestada no município de Abelardo Luz (SC). Fonte: do Autor, 2015.

No Brasil a área invadida com o capim-annoni-2 é extensa e ocorre em diversos estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul) (MEDEIROS; SAIBRO; FOCHT, 2009), existindo a ameaça iminente da expansão para regiões próximas a ela. Esta preocupação é maior para aquelas que apresentam condições bioclimáticas ótimas para o estabelecimento de populações de *E. plana*. Isso porque, além do fato de várias regiões do continente Sul Americano apresentarem características similares àsquelas do local de origem, na África do Sul, a espécie também pode sofrer adaptações a condições edafoclimáticas distintas e não possui inimigos naturais para conter sua expansão em novas regiões (BARBOSA et al., 2013).

Depois de invadir nova área, o capim-annoni-2 tende a se tornar dominante sobre outras espécies da comunidade vegetal (MEDEIROS; FOCHT,

2007). Esta dominância pode ser atingida poucos anos após a sua introdução e é atribuída às suas características de elevada prolificidade e mecanismos de defesa e preservação bem desenvolvidos. O grande poder de disseminação das sementes, especialmente devido à zoocoria, o baixo consumo das plantas pelos animais, elevada competitividade por água, luz e nutrientes com outras espécies vegetais e a inexistência de inimigos naturais também contribuem para a dominância da espécie (REIS; COELHO, 2000).

Sob condições não competitivas, uma única planta de capim-annoni-2 apresenta potencial de produção de até 500.000 sementes, em única estação e por extenso período de tempo, principalmente entre os meses de dezembro e abril, no hemisfério Sul (MACEDO, 1993; KISSMANN; GROTH, 1999). Em um trabalho para determinar a longevidade das sementes, Medeiros et al. (2014) verificaram que as sementes mantêm a viabilidade na superfície do solo por até três anos, enquanto aquelas que foram enterradas podem permanecer viáveis por mais de 20 anos. Além disso, as sementes mantêm sua viabilidade por até oito dias no trato digestivo de bovinos, aumentando o potencial de disseminação espacial (LISBOA et al., 2009).

Outras características da espécie, como as fisiológicas, são tão importantes quanto as previamente descritas. O capim-annoni-2 possui sistema fotossintético de fixação de carbono do tipo C₄, alcançando a máxima assimilação de carbono (25,88 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) em 30 °C (BOTHÁ, 1992). Isso possibilita rápido crescimento dos indivíduos desta espécie quando da ausência de sombreamento, condição comum nas áreas cultivadas com forragens na região Sul do Brasil, dependendo do manejo da pastagem (SCHEFFER-BASSO; CECCHIN; FAVARETTO, 2016). Além disso, o sistema fotossintético C₄ garante maior eficiência dessa espécie em ambientes quentes e secos, por diminuir a fotorrespiração e minimizar a perda de água (TAIZ; ZEIGER, 2010). Ainda, as mudanças climáticas observadas nos últimos anos, com o aumento das temperaturas médias globais e da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, podem acentuar as diferenças observadas entre os mecanismos de fluxo de carbono nos processos fotossintéticos (VALERIA; SANTIAGO, 2011).

O sistema radicular do capim-annoni-2 constitui outro atributo importante da espécie, sendo do tipo fasciculado, espesso, profundo e bem desenvolvido (MACEDO, 1993). As suas raízes são tão extensas e vigorosas que permitiam que o

gado fosse amarrado as suas touceiras nas paradas para alimentação e descanso durante o deslocamento do rebanho por grandes distâncias pelos primeiros colonizadores europeus que chegaram a África do Sul (ARBER, 2010). As raízes da espécie também apresentam maior crescimento na camada mais superficial do solo (0-10 cm) do que as espécies do campo nativo da região Sul do Brasil. Assim, o capim-annoni-2 também leva vantagem competitiva na absorção dos nutrientes presentes na camada superficial do solo (ABICHEQUER et al., 2009).

Todas estas características do capim-annoni-2 ocasionam impactos negativos tanto nos agroecossistemas quanto em ecossistemas naturais. Nos ecossistemas naturais, as espécies de plantas, animais e microrganismos exóticos introduzidos podem ameaçar a biodiversidade das espécies nativas, tendo sido responsabilizadas por declínio de 42 % das populações de espécies ameaçadas de extinção nos Estados Unidos (PIMENTEL, 2011).

O capim-annoni-2 interfere na composição botânica das pastagens, suprimindo as populações de espécies cultivadas e silvestres por meio de relações interespecíficas de alelospolia e alelopatia (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008). Já foram identificados alguns compostos fenólicos com potencial alelopático em extratos da parte aérea e do sistema radicular da planta (FAVARETTO et al., 2015a; FIORENZA et al., 2016). Este é, portanto, outro fator relevante a ser considerado no estudo do processo de invasão do capim-annoni-2, pois o bioma dos Campos da região Sul do Brasil apresenta vulnerabilidade à invasão e conta atualmente com espécies de plantas ameaçadas de extinção que integram complexas redes ecológicas e prestam serviços ambientais de valor incalculável (BOLDRINI, 2009; VALLS et al., 2009).

Este conjunto de fatores destaca a importância econômica, social e ecológica do capim-annoni-2 e têm sido motivador de grande variedade de estudos nas últimas décadas. Devido ao grande número de áreas envolvidas no seu estudo, nem todas foram contempladas com profundidade até o momento. Um exemplo disso são as características ecológicas da germinação, que embora fundamentais para implementação de estratégias eficazes de manejo, são escassos na literatura científica especializada.

Outra área incipiente é a interação da espécie com outras por meio das relações de competição ou alelopatia. Estudos mais aprofundados do potencial

alelopático da espécie, como o levantamento dos aleloquímicos biosintetizados pelas plantas e o processo de liberação dos aleloquímicos no ambiente, por exemplo, podem contribuir na compreensão da interação da espécie com a comunidade vegetal.

Por isso pode-se determinar pelo menos três justificativas importantes para o estudo do capim-annoni-2: pelo impacto biológico, social e econômico da espécie que demanda conhecimento científico a fim de aprimorar as técnicas de manejo; pelo potencial alelopático já comprovado para algumas espécies receptoras que podem possibilitar a identificação de compostos bioativos com ação herbicida, e; por não apresentarem inimigos naturais, supõe-se que a espécie também apresente substâncias de ação repelente e inseticida.

1.1 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese encontra-se dividida em oito capítulos, sendo que no primeiro é apresentada uma visão geral sobre a espécie que é o tema de estudo e a justificativa para realização do presente trabalho, assim como a presente descrição de cada um dos capítulos que o compõe e os seus objetivos e hipóteses.

No segundo capítulo, é apresentada revisão bibliográfica dos tópicos que serão explorados com maior profundidade nos capítulos posteriores, relacionados a características do processo germinativo de *E. plana* e à alelopatia. Em relação à alelopatia, é dado destaque às rotas biossintéticas e mecanismos de ação de compostos fenólicos, em função do estudo ter sido dirigido à sua detecção.

No terceiro capítulo são avaliados os processos de germinação e emergência de capim-annoni-2, considerando principalmente a influência dos fatores ambientais temperatura, exposição a luz, potencial osmótico e salinidade sobre os mesmos. Também é avaliada a influência da profundidade de enterrio das sementes sobre a emergência.

No quarto capítulo são apresentados bioensaios para determinação da fitotoxicidade de extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2, obtidos por meio de extração exaustiva com solventes de diferentes polaridades, sobre plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*). Este bioensaio permitiu verificar a influência dos extratos brutos na concentração de 1 % (v/v) no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das espécies alvo. Também são apresentados os resultados

da identificação e da quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos brutos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No quinto capítulo são apresentados ensaios avaliando a fitotoxicidade do extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 degradada por período de 10 dias sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de alfafa (*M. sativa*), trigo (*T. aestivum*) e braquiária brizantha (*Urochloa brizantha*). Este bioensaio permitiu avaliar o efeito da fitomassa da parte aérea degradada do capim-annoni-2 sobre o processo germinativo e sobre o desenvolvimento das plântulas. Também são apresentados os resultados da quantificação de fenóis totais presentes no extrato aquoso da fitomassa degradada, utilizando a técnica de espectrofotometria.

No sexto capítulo é apresentado o bioensaio para determinação da fitotoxicidade dos extratos aquosos obtidos após diferentes períodos de incubação da fitomassa de capim-annoni-2, da associação fitomassa + solo e somente solo, sobre plântulas de trigo (*T. aestivum*). Também foram realizadas análises dos extratos utilizando a técnica de CLAE, afim de avaliar as modificações na sua composição química nos diferentes períodos de incubação.

No sétimo capítulo são apresentados resultados relativos à identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes na solução do solo de área infestada com capim-annoni-2. As soluções do solo foram obtidas a partir de extração sólido-líquido utilizando álcool metílico como solvente. Este bioensaio permitiu avaliar a distribuição espacial e as concentrações de diferentes compostos fenólicos no solo à partir de uma planta de capim-annoni-2. Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram identificados e quantificados utilizando a técnica de CLAE.

Por fim, o oitavo e último capítulo apresenta as considerações finais do trabalho levando em conta os principais resultados e suas aplicações e desdobramentos. Nesse capítulo, pretende-se relacionar os principais resultados obtidos entre si, integrando-os ao conhecimento já existente, objetivando o estabelecimento de um novo patamar, em que também sejam discutidas as possíveis implicações para o manejo e propostas para pesquisas futuras com o capim-annoni-2.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Determinar a influência de fatores ambientais na germinação e na emergência de plântulas do capim-annoni-2 (*E. plana*) e o potencial alelopático dessa espécie sobre outras espécies vegetais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da temperatura, exposição à luz, potencial osmótico e salinidade na germinação da semente de capim-annoni-2;

- Avaliar a influência da profundidade de enterrio da semente na emergência de plântulas de capim-annoni-2;

- Determinar a fitotoxicidade de extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2 obtidos com hexano, éter dietílico, metanol e água sobre desenvolvimento de plântulas de alfafa e trigo;

- Identificar e quantificar compostos presentes nos extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2 obtidos com hexano, éter dietílico, metanol e água;

- Avaliar o efeito dos extratos aquosos resultantes do processo de degradação da fitomassa de capim-annoni-2 sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de alfafa, braquiária brizanta e trigo;

- Quantificar os compostos fenólicos totais presentes nos extratos aquosos resultantes do processo de degradação da fitomassa de capim-annoni-2;

- Identificar e quantificar compostos fenólicos nos extratos aquosos da parte aérea de capim-annoni-2 degradada;

- Determinar a distribuição espacial de compostos fenólicos com potencial alelopático no perfil do solo em função da proximidade da planta de capim-annoni-2.

1.3 HIPOTETESES

A germinação das sementes depende da temperatura do ambiente, da exposição a luz e da disponibilidade de água e salinidade da solução utilizada. Temperaturas mais elevadas, exposição à luz e ausência de estresse hídrico e salinidade, promovem a germinação das sementes.

A emergência das plântulas depende da profundidade de enterrio das sementes. Sementes de tamanho reduzido apresentam dificuldade de emergência com o aumento da profundidade pela baixa disponibilidade de reservas.

Os extratos brutos da fitomassa de parte aérea, obtidos a partir de solventes de diferentes polaridades, apresentam distintos efeitos fitotóxicos sobre plantas alvo, assim como diferentes compostos com potencial alelopático em sua composição.

O extrato aquoso da fitomassa da parte aérea incubada ocasiona efeito inibitório sobre a germinação e o desenvolvimento de espécies alvo, apresentando elevada concentração de fenóis totais. A fitotoxicidade do extrato aquoso da fitomassa de parte aérea, fitomassa + solo e solo, depende tanto dos períodos de incubação quanto do material incubado. A presença de compostos fenólicos nos extratos aquosos e a concentração de fenóis totais também varia com o período de incubação a qual são submetidas as amostras, com maior fitotoxicidade registrada nos primeiros dias após o início do período de incubação, devido a liberação de aleloquímicos mais elevada.

A solução do solo infestado contém compostos fenólicos com potencial aleloquímico que podem ser relacionados à presença da espécie, havendo uma relação direta entre a proximidade do eixo central das plantas e a concentração de aleloquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica, a primeira seção contém informações sobre alelopatia, a segunda aborda o histórico do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Brasil e a características biológicas dessa espécie, a terceira discorre sobre as suas características como planta alelopática enquanto a quarta explora a atividade alelopática de compostos fenólicos, sua via de biossíntese em plantas, as interações com o ambiente e os mecanismos de ação em plantas alvo.

2.1 INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS

A interação entre organismos mediada por compostos químicos tóxicos é denominada alelopatia. Este termo foi cunhado pelo botânico tcheco-austríaco Hans Molish (1856-1937), que foi professor emérito e diretor do Instituto de Fisiologia Vegetal da Universidade de Viena, em um de seus livros (*Der Einfluß einer Pflanze auf die andere Allelopathie*), após ter estudado por anos as interações entre espécies vegetais (MOLISCH, 2001).

No entanto, interações desta natureza, entre plantas, foram registradas antes mesmo do termo ser cunhado. Teophrastus (300 a.C.), discípulo de Aristóteles, deixou registradas observações acerca da interação negativa entre espécies vegetais nos livros *De Causis Plantarum*, que constituem os primeiros registros botânicos que sobreviveram desde a antiguidade clássica, tratando de assuntos relacionados à fisiologia vegetal. Atualmente, muitas espécies de plantas são consideradas “fábricas químicas”, produzindo e liberando substâncias químicas que podem apresentar efeito estimulante, neutro ou inibitório nos processos biológicos associados a elas.

Os compostos químicos produzidos pelas plantas doadoras que apresentam efeito sobre as receptoras são denominados aleloquímicos. Estes compostos são produtos do metabolismo especializado (secundário) ou do metabolismo primário, sendo que os produtos do secundário podem representar até 10 % do total da massa seca de algumas espécies vegetais. Acredita-se que esses compostos são produzidos para exercerem funções ecológicas específicas, como resposta a estímulos ambientais diversos, geralmente não apresentando função aparente no metabolismo primário das plantas (HELDT; PIECHULLA; HELDT, 2011). A produção de todos os metabólitos especializados das plantas depende da existência e da expressão de genes específicos (FANG et al., 2013) e de outros fatores

ambientais, como fertilidade do solo, densidade de plantas, idade e estágio metabólico, estiagem e exposição à luz (KOHLI; BATISH; SINGH, 2006).

Substâncias químicas com potencial alelopático estão em todos os tecidos de plantas (PUTNAM, 1987). Sua presença varia em quantidade e qualidade e de espécie para espécie. As quantidades de substâncias potencialmente alelopáticas produzidas variam de local de ocorrência ou estágio de desenvolvimento para outro, pois sua síntese depende da influência de fatores genéticos e ambientais, bióticos e abióticos (ALMEIDA, 1988; EINHELLIG, 1996; FERREIRA; AQUILA, 2000; MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

Apesar da maioria dos trabalhos com alelopatia abordarem as folhas das plantas como fonte para obtenção dos extratos, as substâncias alelopáticas podem apresentar uma distribuição desuniforme nos diferentes órgãos e tecidos ao longo da vida da planta (SOUZA FILHO; TREZZI; IOUE, 2011). Esta influência pode ser atribuída ao fato de que muitos trabalhos avaliando a alocação de aleloquímicos, como os de Chon e Kim (2002), Rashid, Asaeda e Uddin (2010) e Favaretto et al. (2015), tenham apontado maior concentração de aleloquímicos nas folhas do que em outras partes da planta. No entanto, esta não é uma regra geral, pois algumas espécies apresentam maiores concentrações de aleloquímicos em órgãos menos estudados, como raízes (NETZLY; BUTLER, 1986), frutos (SHAO et al., 2012) e sementes (SOUZA FILHO, 2002).

Conforme sua similaridade química, grupos funcionais e suas vias de biossíntese, é possível classificar os compostos fitotóxicos (aleloquímicos) em diferentes categorias (MACÍAS et al., 2007). Os efeitos alelopáticos de uma planta sobre outra podem ser mediados por substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos químicos. A estrutura química dos aleloquímicos produzidos e suas concentrações diferem entre espécies, tecidos e órgãos vegetais.

O capim-annoni-2 é uma das espécies que se beneficia da interação alelopática entre plantas. Nos agroecossistemas, esta espécie tem aumentado sua população a partir da supressão de outras espécies da comunidade vegetal. Supõem-se que os compostos químicos detectados em extratos de tecidos atuem negativamente sobre a germinação e o desenvolvimento de várias espécies nativas e exóticas.

2.1.1 Liberação de aleloquímicos no meio

Geralmente as substâncias alelopáticas produzidas pela planta doadora têm o solo como veículo para que sejam absorvidas pelas plantas alvo. A liberação dos aleloquímicos da planta doadora ao ambiente pode ocorrer de duas formas diferentes. Primeiramente, por meio da degradação de tecidos de plantas sobre a superfície do solo, ou pela transformação de compostos químicos presentes no solo em compostos alelopáticos mediada por microrganismos ou pela sua interação com o meio. Outra forma de liberação dos aleloquímicos das plantas ocorre diretamente pelas raízes ou pelas folhas, de forma ativa (BONANOMI et al., 2006).

Enquanto a incorporação do material vegetal ao solo garante a liberação rápida dos aleloquímicos devido ao rompimento dos tecidos e do maior contato do material com o solo, a deposição do material na superfície do solo resulta em liberação lenta e por um intervalo de tempo maior. A incorporação do material ao solo também aumenta a distribuição espacial dos compostos, que atingem maiores profundidades do que quando permanecem na superfície. Quando o material é incorporado ao solo, as concentrações dos aleloquímicos são maiores, mas permanecem por menor tempo do que quando depositados na superfície (SCHONBECK, 2015).

A relação carbono-nitrogênio (C:N) é outro fator determinante na degradação dos tecidos vegetais, que interfere na liberação dos aleloquímicos. Enquanto espécies dicotiledôneas, como as leguminosas, apresentam valor C:N de aproximadamente 12, espécies poáceas apresentam valores próximos a 50. Valores mais altos significam maior proporção de carbono em relação ao nitrogênio e resultam em tecidos mais resistentes à degradação, liberando os aleloquímicos mais lentamente que aqueles com valores menores. Desta forma, é esperado que solos cobertos com espécies poáceas apresentem concentrações menores de aleloquímicos do que os cobertos com dicotiledôneas, no período inicial de degradação, mas a liberação ocorre por período de tempo maior (BALDWIN; CREAMER, 2006).

Os teores de lignina e as relações lignina:N e lignina:P nos tecidos das plantas também são determinantes na sua degradação. Em geral, os resíduos vegetais de plantas de adubação verde com maior teor de lignina e valores de relação C:N, lignina:N e lignina:P, como aqueles da aveia preta e do centeio, são decompostos e liberam os nutrientes para o solo de forma lenta e gradual (GIACOMINI et al., 2003).

Resíduos com menor teor de lignina, conseqüentemente, maior teor de celulose, menor valor da relação C:N, lignina:N e lignina:P, como o nabo-forrageiro, apresentam decomposição e liberação de nutrientes mais rápidas (CRUSCIOL et al., 2005).

A liberação dos aleloquímicos pela degradação dos tecidos já foi bastante estudada por trabalhos realizados com sistemas de adubação verde e plantio direto, o que não é possível afirmar sobre liberação direta. Enquanto o processo de degradação ocorre a partir da morte do tecido, o último processo ocorre com a planta viva. Comparada à liberação pela degradação dos tecidos, a liberação direta de aleloquímicos é um processo que apresenta maior dificuldade metodológica para seu estudo.

O sorgoleone, produzido por *Sorghum bicolor*, é um exemplo de substância cuja liberação é direta (YANG, 2004). O sorgoleone é liberado continuamente por pêlos radiculares (CZARNOTA et al., 2003) enquanto a planta de sorgo encontra-se viva, acumulando-se no solo e inibindo a germinação e o desenvolvimento das plantas alvo suscetíveis, pela inibição da fotossíntese (RIMANDO et al., 1998) e transporte de elétrons (CZARNOTA et al., 2001).

Outro exemplo de compostos liberados de forma ativa são os terpenóides, que correspondem a um grupo com mais de 1.000 substâncias extremamente voláteis (BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998). Sintetizados pela via do mevalonato ou do 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP), os terpenóides são liberados ativamente pelas folhas, flores ou frutos de inúmeras espécies vegetais (AHARONI et al., 2003).

2.1.2 Comportamento de aleloquímicos no solo

Quando na matriz do solo, a disponibilidade dos aleloquímicos para serem absorvidos pelas plantas alvo depende da sua interação com o solo. Ao entrarem em contato com o solo, os aleloquímicos também podem ser adsorvidos, transformados por processos físicos, químicos, biológicos ou ainda serem lixiviados ou volatilizados. Todos estes processos alteram a estrutura química original dos aleloquímicos ou a sua disponibilidade para as plantas alvo (BLUM, 2006; CHEN et al., 2011; TIMBERLAKE, 2015; VIDAL; BAUMAN, 1997) (Figura 2.1).

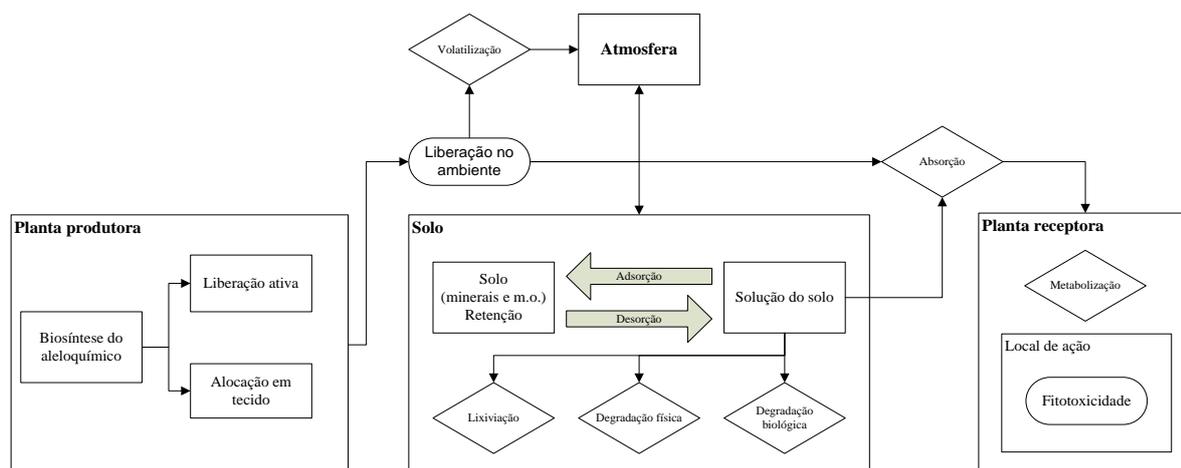


Figura 2.1 – Diagrama esquemático simplificado dos mecanismos envolvidos na transformação, transporte, degradação e disponibilização de aleloquímicos para absorção por plantas alvo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

Os mesmos fenômenos observados na dinâmica de nutrientes e agroquímicos sintéticos no solo podem ser aplicados para entender o comportamento dos aleloquímicos. A adsorção é um dos fenômenos aos quais os aleloquímicos estão sujeitos quando se encontram no solo. Esse processo geralmente contribui para a diminuição na quantidade do aleloquímico disponível para ser absorvido pelas plantas alvo. A adsorção é um processo que depende de características do solo como pH, granulometria, teor de matéria orgânica e também das características físico-químicas do composto alelopático.

De forma geral, os aleloquímicos apresentam maior adsorção ao solo com o aumento na capacidade de troca de cátions (CTC), da área superficial específica das partículas do solo e também com o teor de carbono orgânico (SILVA; SILVA, 2009; VIDAL; BAUMAN, 1997), similarmente a outros compostos orgânicos com atividade herbicida utilizados na agricultura.

Este tipo de interação pode ser química ou física, também consideradas adsorção direta e indireta, respectivamente. Na adsorção química (ligações iônicas com forças de Coulomb), os aleloquímicos tendem a ficar retidos ao solo com elevada intensidade, enquanto na adsorção física (ligações de van Der Waals), esta retenção tende a ser de baixa intensidade. A classificação em uma categoria ou outra depende da força de adsorção ou da forma de ligação ao solo, que se forem altas caracterizam ligação química e se forem baixas caracterizam ligação física (ANDERSON, 1983). Na adsorção química (direta), íons são atraídos por sítios de adsorção que possuem

carga contrária. A maior parte das partículas de argila, assim como a matéria orgânica, contém sítios de adsorção carregados negativamente, mas também podem conter sítios carregados positivamente. Desta forma, o solo tende a adsorver mais facilmente cátions, mas em algumas situações também pode reter ânions. Portanto, o nível de atração entre os íons e as partículas do solo será o resultado da interação entre os campos de força da parte adsorvente e da parte adsorvível (ANDERSON, 1983).

A adsorção é um processo de interação temporário, independentemente do nível de atração entre o solo e os aleloquímicos. Por isso, o processo no qual as moléculas retidas pelo processo de adsorção retornam à solução do solo é chamado dessorção. Desta forma, elas podem ser absorvidas pelas plantas alvo ou ficar sujeitas a processos de transformação e transporte. Portanto, o balanço entre os processos de adsorção e dessorção é determinante na concentração dos aleloquímicos que estarão presentes na solução do solo (KOBAYASHI, 2004).

As características moleculares dos aleloquímicos podem ser determinantes no seu comportamento no ambiente, incluindo sua interação com o solo. Na Tabela 2.1 podem ser consultadas características físico-químicas de alguns aleloquímicos, incluindo o respectivo coeficiente de partição octanol água ($\log K_{ow}$), que podem auxiliar na previsão do comportamento dessas substâncias quando em contato com o solo.

De maneira geral, pode-se dizer que existe relação inversamente proporcional entre o coeficiente de sorção de moléculas herbicidas ao carbono orgânico do solo (K_{oc}) e a sua solubilidade em água. Ou seja, quanto mais solúveis em água forem as moléculas menor será sua adsorção à matéria orgânica do solo (ROSS; LEMBI, 2008), porém isso não é uma regra geral.

Tabela 2.1. Peso molecular, densidade, coeficiente de partição octanol água, capacidade de dissociação eletrolítica e solubilidade em água de alguns aleloquímicos da classe dos compostos fenólicos com propriedades alelopáticas. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Nome do aleloquímico | Peso molecular [g mol ⁻¹] | Densidade [g cm ⁻³] ^{ab} | Coeficiente de partição octanol água [log K _{ow}] ^{ab} | Capacidade de dissociação eletrolítica [pK _a] ^b | Solubilidade em água [mg L ⁻¹] ^b |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
| Ácido benzóico | 122,12 | 1,27 (20 °C) | 1,87 | 4,19 | 3.500 (25 °C) |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 138,12 | 1,46 (25 °C) | 1,58 | 4,54 | 5.000 (25 °C) |
| Ácido gálico | 170,12 | 1,69 (20 °C) | 0,70 | 4,40 | 11.900 (25 °C) |
| Ácido vanílico | 168,15 | n/d | 1,43 | 4,51 | 1.500 (14 °C) |
| Ácido cinâmico | 148,16 | 1,25 (20 °C) | 2,25 | n/d | n/d |
| Quercetina | 302,24 | n/d | 1,48 | 7,17 | 60 (16 °C) |
| Juglona | 174,16 | n/d | 1,92 | n/d | n/d |

n/d = informação não disponível.

Fontes: ^a Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (2015), ^b U.S. National Center for Biotechnology Information (2015).

Uma das formas de classificar compostos quanto à sua afinidade com a água ou lipídios é determinando o seu coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) (Equação 2.1):

$$K_{ow} = C_o / C_w [2.1]$$

Em que: C_o é a concentração do composto em octanol e C_w é a concentração do composto em água.

Essa propriedade pode ser utilizada para descrever a afinidade da substância em relação a polaridade do solvente: água (polar) ou octanol (apolar). Os valores de K_{ow} são adimensionais, geralmente são expressos na forma logarítmica (log K_{ow}) (SILVA; SILVA, 2009) e nesse caso variam de -3 a 7. Quanto menor a lipofilicidade da molécula orgânica (menor log K_{ow}), maior a solubilidade em água da substância (EVANGELOU, 1998). Outras propriedades determinantes na adsorção de moléculas ao solo são a sua solubilidade em água (S) e a sua capacidade de dissociação eletrolítica (pK_a).

2.2 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS DO CAPIM-ANNONI-2

Os efeitos adversos sobre a produção agropecuária oriundos das frequentes secas ocorridas entre as décadas de 1880 e 1930 na África, Oceania e América do Norte criaram uma demanda mundial por espécies forrageiras tolerantes ao estresse hídrico para serem utilizadas na produção agropecuária. Após avaliação

de várias espécies vegetais mundo afora, entre outras, foram selecionadas as gramíneas africanas *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, *E. lehmanniana* Nees, *Cenchrus ciliaris* L. e *Panicum coloratum* L., que possuíam em comum características de rápido estabelecimento, elevada persistência no ambiente e produtividade forrageira (ZEID et al., 2011).

Cerca de 20 anos após a busca por espécies forrageiras adaptadas à baixa pluviosidade, o capim-chorão (*E. curvula*) foi trazido ao Brasil, mais especificamente para o estado do Rio Grande do Sul. Acredita-se que o lote de sementes de capim-chorão importadas da África do Sul encontrava-se contaminado com sementes de *E. plana* (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Contaminações biológicas de sementes são mais fáceis de ocorrer em gêneros com elevado número de espécies, como é o caso do *Eragrostis*. Além de possuir entre 250 a 300 espécies, o gênero *Eragrostis* é considerado difícil para diferenciação taxonômica interespecífica, em virtude de similaridades morfológicas (HOLM, 1997).

Os dois primeiros registros de *E. plana* no Brasil ocorreram na década de 1950 no estado do Rio Grande do Sul, na fazenda do Grupo Rural Annoni, no município de Sarandi e outro na Estação Experimental Zootécnica de Tupanciretã. Por se tratarem de locais distantes quase 400 km entre si e das divergências dos relatos naquela época, ainda é incerto qual dos registros ocorreu primeiro (MACEDO, 1993). Sabe-se no entanto, que por vários anos desde os primeiros registros, a espécie foi equivocadamente identificada como *E. abyssinica* (BOECHAT; VALLS, 1986).

A resistência ao pisoteio, à geada e à seca são características ecológicas de *E. plana* que fizeram com que a espécie fosse comercializada à partir da década de 1970 como forrageira, com o nome popular de capim-annoni-2 (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Este nome foi dado pelo Grupo Rural Annoni, que já possuía outra espécie forrageira sendo comercializada com a alcunha de capim-annoni-1 (*Setaria vaginata*) quando do seu lançamento (MACEDO, 1993). Naquela época era possível encontrar o capim-annoni-2 sendo divulgado nas seções Rurais dos jornais do RS como espécie forrageira capaz de revolucionar a produção agropecuária (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Reprodução de nota de divulgação do capim-annoni-2 na seção “Suplemento Rural” de jornal do Rio Grande do Sul na década de 1970. Fonte: Vinícius Machado, 2015.

Poucos anos após o início da comercialização do capim-annoni-2, principalmente na região Sul do Brasil, vários trabalhos de pesquisa visando a determinação do seu potencial forrageiro concluíram que a mesma apresentava desvantagens em relação às espécies tradicionalmente cultivadas, devido a sua baixa qualidade nutricional e palatabilidade (NASCIMENTO; HALL, 1978). Além disso, foi percebido que as plantas adultas, com folhas e colmos maduros, provocavam o desgaste acelerado dos dentes dos animais, em virtude do elevado teor de fibras (FERREIRA, 2011). Estas observações contrariaram a publicidade previamente utilizada, que exaltava sua utilização como forrageira.

Não bastasse a baixa qualidade como pastagem, também foi verificado que *E. plana* apresentava características de planta invasora de difícil manejo. Por conta disso, a portaria nº 205 de 1979 do Ministério da Agricultura, proibiu a comercialização, transporte, importação e exportação de sementes e mudas de *E. plana*. Mesmo com a portaria visando restringir a sua disseminação, trabalhos realizados por Medeiros, Pillar e Reis (2004) projetaram que 20 % da área do bioma campo no estado do Rio Grande do Sul estaria infestada pela espécie no ano de 2008, com aumento de 100 % da área infestada em quatro anos. Nesta região, Medeiros e Focht (2007) estimaram que a área total invadida pelo capim-annoni-2 superaria um milhão de hectares.

Do ponto de vista ecológico, a prolificidade do capim-annoni-2, sua rusticidade e a capacidade competitiva podem explicar parte da sua adaptação a

diferentes condições ambientais. Estas características também facilitam a compreensão da sua eficiência na colonização de novos ambientes, como tem sido observado na região Sul do Brasil e nos países vizinhos limítrofes a esta região. No entanto, assim como ocorre com muitas outras plantas, o metabolismo secundário do capim-annoni-2 e o impacto dos seus produtos sobre outras espécies vegetais ainda permanece pouco compreendido atualmente. Isto porque ainda são escassos na literatura científica trabalhos com *E. plana* que abordem a prospecção de substâncias alelopáticas, modelem a liberação dos compostos e monitorem a sua dinâmica no ambiente.

2.3 INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENVOLVENDO O CAPIM-ANNONI-2

Apesar do pequeno número de trabalhos investigando a atividade alelopática do capim-annoni-2, alguns trabalhos já comprovaram a bioatividade da fitomassa e de seus extratos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de espécies cultivadas e daninhas. Em um dos trabalhos pioneiros, Coelho (1986) identificou o efeito deletério da fitomassa de capim-annoni-2 na germinação e no desenvolvimento de plântulas de trevo-branco (*Trifolium repens*) e no desenvolvimento de plântulas de azevém (*Lolium multiflorum*). A fitomassa de capim-annoni-2 também diminuiu a germinação de grama batatais (*Paspalum notatum*) e setária (*Setaria sphacelata*) (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008). Extratos da parte aérea e do sistema radicular prejudicaram o desenvolvimento de plântulas de trevo branco (*T. repens*) (FAVARETTO et al., 2011). As espécies invasoras corda-de-violão (*Ipomoea grandifolia*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) também apresentaram redução na germinação e no desenvolvimento de plântulas nos tratamentos com extratos da parte aérea e do sistema radicular do capim-annoni-2 (DALBOSCO, 2013; SILVA, 2014).

No isolamento, identificação e quantificação de potenciais aleloquímicos, trabalhos com extratos da planta registraram a presença de ácido ferúlico, caféico, vanílico e cumárico nas folhas e raízes e catequina e epicatequina nas folhas (FAVARETTO et al., 2015a). Também foram identificados um triacilglicerol e um rotenóide inéditos em frações do extrato de acetato de etila (KLEIN, 2015). Além de fazerem parte dos produtos do metabolismo do capim-annoni-2, estes compostos já

foram identificados em tecidos de diversas outras espécies da família Poaceae (BRAVO; COPAJA; LAMBOROT, 2013).

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Dentre as diversas classes de compostos químicos produzidos por plantas que apresentam fitotoxicidade, uma das mais estudadas, devido aos inúmeros casos de fitotoxicidade reportados, é a dos compostos fenólicos (INDERJIT, 1996). Estes compostos apresentam diversidade de tamanhos de moléculas e complexidade, e com mais de 8.000 estruturas químicas conhecidas atualmente (DAI; MUMPER, 2010), sendo amplamente encontrados na natureza (SOLOMONS, 2012). Apesar da diversidade, todos os compostos fenólicos possuem em comum em suas estruturas um anel aromático e ao menos um grupo hidroxila ligado a ele (Figura 2.3).

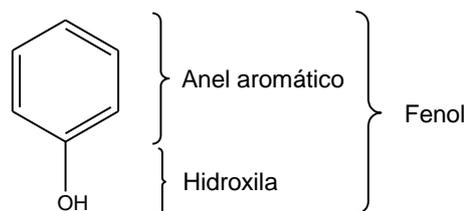


Figura 2.3 – Estrutura química do fenol, o mais simples composto fenólico, com os respectivos constituintes que caracterizam a classe química dos fenólicos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Parte dos compostos fenólicos possuem a característica de serem solúveis em água em virtude da sua habilidade em formar ligações de hidrogênio com moléculas de água (SOLOMONS, 2012). Assim como os álcoois, os fenóis também apresentam elevados pontos de ebulição, por causa das ligações de hidrogênio. Além disso, compostos fenólicos podem ser considerados ácidos e bases fracas, o primeiro grupo quando doam um próton em meio aquoso para água e o segundo grupo quando são protonados reversivelmente por ácidos fortes (MCMURRY, 2008).

O fenol é a unidade básica dos compostos fenólicos biossintetizados por plantas. Apesar de muitos dos fenólicos constituírem componentes estruturais das paredes celulares, outros muitos são compostos de defesa da planta, corantes e aromas de flores e frutas e antioxidantes de madeira, casca e sementes (HELDT; PIECHULLA; HELDT, 2011; KUTCHAN et al., 2015).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de formas distintas: de acordo com os grupos funcionais ligados ao fenol, com o número de unidades fenol presentes na molécula, entre outras (KUTCHAN et al., 2015). Em uma forma simples de classificação, é possível classificar o composto fenólico de acordo com seu esqueleto funcional, distinguindo-se as principais subclasses produzidas por plantas: fenilpropanóides (C_3-C_6) ou acetato-fenilpropanóides ($C_6-C_3-C_6$) (Figura 2.4) (DAI; MUMPER, 2010).

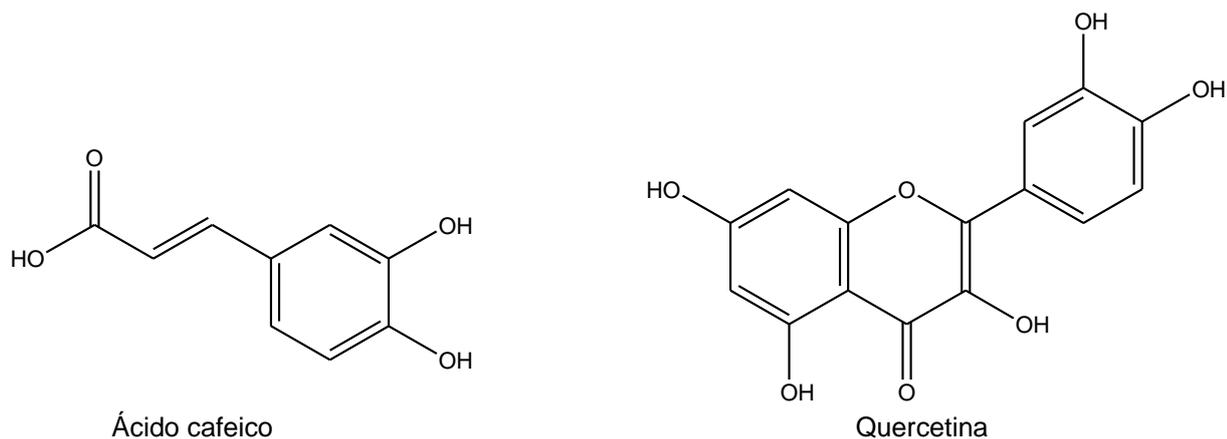


Figura 2.4 – Exemplos de estruturas químicas de fenilpropanóide (Ácido caféico) C_6-C_3 e de acetato-fenilpropanóide (Quercetina) $C_6-C_3-C_6$. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A formação de compostos fenilpropanóides com estrutura nuclear do tipo C_6-C_3 ou acetato-fenilpropanóides com estrutura $C_6-C_3-C_6$, depende da via de biossíntese pela planta, mas em ambos o precursor da maioria dos compostos fenólicos é o 4-cumaroil-COA (KUTCHAN et al., 2015).

2.4.1 Biossíntese de compostos fenólicos

A biossíntese dos compostos fenólicos é realizada a partir de rotas bioquímicas em sequência, com diferentes produtos intermediários e enzimas. A biossíntese inicia-se com a utilização de L-fenilalanina (produto da via do ácido chiquímico) como metabólito primário, sendo que a L-tirosina, apesar de muito menos comum e da participação questionada em alguns trabalhos, pode também ser utilizada (KUTCHAN et al., 2015) (Figura 2.5).

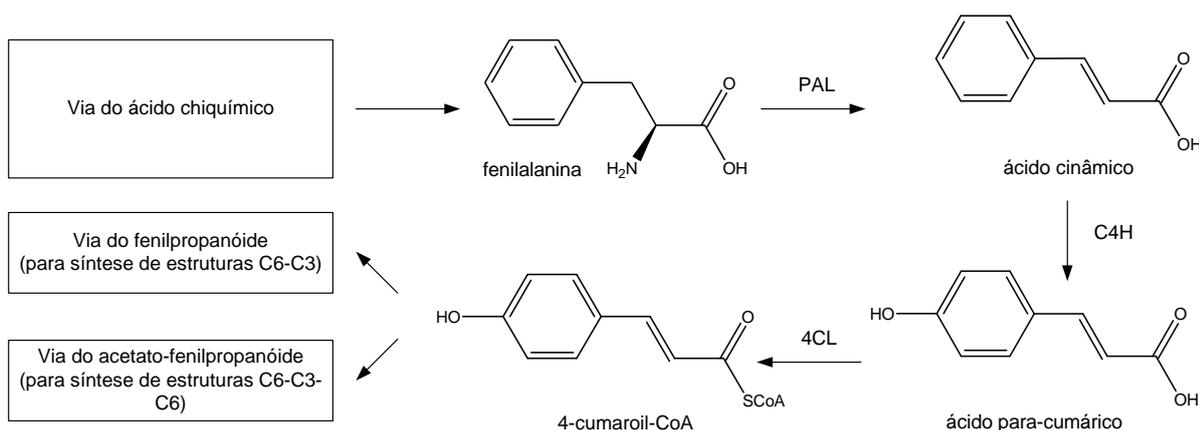


Figura 2.5 – Visão geral das vias de biossíntese, compostos intermediários e enzimas envolvidas na produção da maioria dos compostos fenólicos. Adaptado de Kutchan et al. (2015). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A enzima PAL (Fenilalanina Amônia Liase) catalisa o primeiro passo da biossíntese dos compostos fenólicos, provocando desaminação (liberação do NH_3) da fenilalanina que resulta em ácido cinâmico e amônia. A amônia é espontaneamente protonada no citosol e vira NH_4^+ , enquanto que o ácido cinâmico é convertido em ácido para-cumárico pela enzima C4H (Trans-cinamato 4 Mono-oxigenase), que é uma monoxigenase do citocromo p-450 que se encontra ligada à membrana (HELDT; PIECHULLA; HELDT, 2011). Por fim, o ácido *p*-cumárico é convertido em 4-cumaroil-CoA pela enzima 4CL (4-Cumarato-CoA Ligase), que corresponde à unidade inicial que será utilizada na via do acetato-fenilpropanóide ou na via do fenilpropanóides. A primeira via é utilizada para biossíntese de moléculas com estruturas C₆-C₃-C₆ (como por exemplo flavonóides, estilbenos, isoflavonóides ou cumarinas), enquanto a segunda leva à formação de moléculas com estruturas C₆-C₃ (como por exemplo lignanas, ligninas ou fenilpropenos) (KUTCHAN et al., 2015).

2.4.2 Comportamento de compostos fenólicos no solo

A maior parte dos fenóis é adsorvida ao solo pelas ligações de hidrogênio na superfície das partículas do solo (BOYD, 1982). Os ácidos fenólicos hidroxibenzóico, vanílico, cumárico e ferúlico possuem elevada afinidade com sítios específicos do solo, especialmente com a matéria orgânica. Por isso, a adsorção destes compostos na matriz do solo tende a diminuir com a diminuição do teor de matéria orgânica (THARAYIL; BHOWMIK; XING, 2006).

Além disso, a adsorção de fenóis apresenta correlação inversamente proporcional ao número de compostos fenólicos presentes na solução devido ao aumento do efeito de competitivo. Ou seja, a presença de um composto na solução do solo pode alterar a adsorção de outro à matriz (BOYD, 1982). O efeito de competição por sítios específicos no solo foi observado na mistura de quatro ácidos fenólicos: ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido cumárico e ácido ferúlico. Este efeito foi observado mesmo quando os ácidos fenólicos estavam em baixas concentrações. Por exemplo, 95 % do ácido vanílico foi dessorvido da matriz do solo na presença de ácido cumárico (THARAYIL; BHOWMIK; XING, 2006).

Ácidos fenólicos tendem a adquirir carga negativa ou positiva dependendo do respectivo pKa e do pH do solo/solução. Um solo ou solução com pH maior que o pKa do ácido fenólico tende a ionizar as moléculas, deixando-as com cargas negativas. Essa característica tende a modificar o processo de adsorção do composto com o solo/solução (BLUM, 2011). A modificação dos fenóis pela introdução de grupos CH₃, OCH₃, NO₂ ou Cl resultaram em aumento na adsorção dos compostos fenólicos ao solo (BOYD, 1982).

O processo de sorção pode ser modelado para facilitar a compreensão da relação aleloquímico e sorvente, como proposto por Herbert Freundlich. Em experimento conduzido com o intuito de identificar o modelo de adsorção de ácidos fenólicos ao solo, Vidal (1995) constatou que o ácido salicílico ajustou-se ao modelo isotérmico de adsorção do tipo L, em que há elevada afinidade pelo sorvente. Enquanto que catequina e ácido ferúlico se ajustaram ao modelo isotérmico do tipo S, em que a afinidade com o sorvente se modifica a medida em que progride a sorção, devido a competição do sorvente ou criação de novos sítios de sorção.

Além da adsorção, a degradação é outro processo que pode ocorrer com os compostos fenólicos presentes no solo. Já foi comprovado, por exemplo, que a bactéria *Pseudomonas putida* consegue realizar o processo de degradação biológica de quercetina e naringenina (PILLAI; SWARUP, 2002). Também já foram registrados processos de fotodegradação de compostos fenólicos, principalmente em trabalhos estudando o tratamento de efluentes contaminados com poluentes orgânicos. Na fotodegradação de compostos fenólicos tanto o pH do meio quanto o comprimento de onda da luz parecem ser determinantes na obtenção de altos níveis de degradação destes compostos (WOJNÁROVITS; TAKÁCS, 2016). Devido a polaridade de grande

parte dos compostos fenólicos, e em virtude disso sua afinidade com a água ser elevada, os compostos fenólicos presentes no solo podem sofrer diminuição da sua concentração no solo pelo processo de lixiviação (BRANCO et al., 2013). Por fim, reações químicas como a oxidação podem resultar na formação de quinonas a partir de compostos fenólicos (MCMURRY, 2008).

No entanto, quando os compostos fenólicos não sofrem a influência de nenhum dos processos apresentados a cima, eles tendem a se encontrar na solução do solo livres para serem absorvidos. Teoriza-se que os aleloquímicos possam ser absorvidos pelo sistema radicular das plantas alvo, assim como são absorvidos alguns dos herbicidas utilizados na agricultura. Estudo realizado por Glass e Bohm (1971) verificou a absorção ativa de diversos compostos fenólicos com reconhecida atividade alelopática, cuja capacidade é influenciada por características do solo. Além disso, a entrada de aleloquímicos em algumas plantas alvo também pode ser facilitada pela relação simbiótica dos vegetais com fungos micorrízicos (ACHATZ; RILLIG, 2014).

2.4.3 Mecanismos de ação de compostos fenólicos

Os aleloquímicos podem apresentar diferentes mecanismos de ação, de acordo com suas características químicas. Dentre os mecanismos de ação de aleloquímicos já conhecidos estão a interferência na síntese ou degradação de giberelina e de ácido indol acético, com reflexos na divisão e no alongamento celular e na inibição do crescimento. Também, é reconhecida sua ação na absorção de minerais, na inibição da fotossíntese, na inibição/estimulação da respiração, na inibição/estimulação da abertura dos estômatos, na inibição da síntese de proteínas, na inibição da síntese de hemoglobina (rizóbio), na modificação da permeabilidade de membranas e na inibição de enzimas específicas (pectolítica, celulase, catalase e peroxidase e fosforilase) (RICE, 1974).

Uma vez dentro dos pelos radiculares, os aleloquímicos precisam atingir o sistema vascular para que possam ser transportados até o local de ação. É possível que os aleloquímicos utilizem uma das duas rotas disponíveis para essa finalidade: sistema apoplástico através dos espaços intercelulares ou simplástico pelo interior do citoplasma das células. Uma vez no xilema ou floema, os compostos orgânicos hidrofílicos como os fenóis podem então ser transportados por maiores distâncias, chegando aos locais de ação (COBB; READE, 2010).

Os compostos fenólicos podem atuar inibindo a germinação e o desenvolvimento de plantas, mas também podem ocasionar inibição indireta quando influenciam a dinâmica de nutrientes e a sua disponibilidade para as plantas (CHENG; CHENG, 2015; LI et al., 2010). No entanto, em virtude desses compostos possuírem características físico-químicas variáveis e muitas vezes distintas entre si, levam a crer que possam existir múltiplos mecanismos de ação envolvidos (EINHELLIG, 2004).

Os mecanismos de ação do ácido cinâmico e benzóico foram estudados de forma mais minuciosa até o momento e por isso são os melhor conhecidos. De forma geral, a toxicidade destes compostos costuma ser maior sobre o desenvolvimento de plântulas do que na germinação das sementes. Trabalhos já reportaram a ação dos ácidos cinâmico e benzóico no comportamento de hormônios vegetais, na absorção de minerais, no balanço hídrico da planta, no funcionamento dos estômatos, na fotossíntese, na respiração, na síntese de certos compostos orgânicos e também no fluxo de carbono (EINHELLIG, 1996, 2004).

Um dos mecanismos de inibição do crescimento de plantas pelos ácidos benzóico e cinâmico ocorre devido a alteração de propriedades da membrana celular (GLASS, 1973). Isso porque estes ácidos fenólicos ocasionam um aumento na permeabilidade da membrana a íons inorgânicos, inibindo o transporte ativo de íons (GLASS; DUNLOP, 1974). Segundo Einhellig (2004), trabalhos futuros poderão revelar a especificidade das atividades destas substâncias em proteínas de canais, bombas de prótons ou transportadores de membrana.

Os efeitos do ácido benzóico e cinâmico na membrana celular, e consequentemente na retenção e fluxo de íons, é determinante para a condição hídrica da planta alvo. Trabalho realizado por Einhellig (2004) aponta para redução do potencial hídrico das folhas, da pressão de turgescência, da condutância e modificação na proporção isótopo de carbono e tecido. Determinadas concentrações podem, inclusive, ocasionar sintomas similares àqueles observados em plântulas sob estresse hídrico (EINHELLIG, 2004).

Outro mecanismo de ação dos ácidos fenólicos pode ocorrer sobre a atividade enzimática. Devi e Prasad (1992) identificaram uma redução significativa na atividade de enzimas hidrolíticas em plantas tratadas com ácido ferúlico, sugerindo inclusive que este pode ser um mecanismo de ação comum a outros compostos

fenólicos. A redução da atividade das enzimas foi correlacionada com a redução no comprimento de radícula e de hipocótilo das plântulas (DEVI; PRASAD, 1992).

Os ácidos fenólicos podem ainda reduzir a capacidade fotossintética, diminuindo a condutância estomática e os teores de clorofila *a* e *b*. Este mecanismo de ação dos ácidos fenólicos pode gerar diminuição na capacidade de desenvolvimento das plântulas alvo, reduzindo o comprimento de radícula e do hipocótilo (ALSAADAWI; AL-HADITHY; ARIF, 1986; BAZIRAMAKENGA; SIMARD; LEROUX, 1994; EINHELLIG; RASMUSSEN, 1979).

Ainda, os ácidos fenólicos podem interferir no metabolismo respiratório das plantas. O seu mecanismo de ação pode ser direto sobre as funções da mitocôndria ou aumentando a demanda respiratória para suprir energia visando o reparo da membrana. No entanto, a concentração de ácidos fenólicos necessária para suprimir a atividade da mitocôndria é considerada alta, mas esse efeito pode não ser desprezível quando ocorre simultaneamente a outros mecanismos de ação (EINHELLIG, 2004).

Sabe-se ainda que os ácidos fenólicos apresentam efeito sobre o fluxo de carbono, alterando o padrão normal de síntese celular. As alterações no fluxo de carbono para os constituintes celulares observadas em células tratadas com ácidos fenólicos podem explicar parcialmente porque esses compostos inibem o crescimento e desenvolvimento de plantas e a germinação de sementes (DANKS; FLETCHER; RICE, 1975).

Os ácidos fenólicos, as cumarinas e os taninos parecem apresentar mecanismos de ação semelhantes, inibindo o crescimento das plantas alvo por efeitos fisiológicos múltiplos que conferem citotoxicidade (EINHELLIG, 2004). No entanto, além dos já descritos, eles podem apresentar ainda outros mecanismos de ação graças a suas diferenças estruturais.

Diferentemente dos ácidos fenólicos, a cumarina e a escopoletina, que são conhecidos aleloquímicos, já tiveram reportada sua atuação no processo de divisão celular. Esses compostos dificultam a mitose de células radiculares e do hipocótilo de plantas alvo, diminuindo o seu crescimento e também a atividade da enzima glutathione-S-transferase (AVERS; GOODWIN, 1956; HOSSAIN et al., 2008). No entanto, estes resultados parecem ser questionáveis pois, contraditoriamente,

Abenavoli et al. (2001) reportaram aumento da absorção e da translocação de nitrato das raízes para a parte aérea de trigo em determinadas concentrações de cumarina.

As cumarinas também interagem com o processo hormonal das plantas alvo, uma vez que já foram responsabilizadas pela indução da síntese de etileno e pelo antagonismo com ácido abscísico no processo de inibição do crescimento e fechamento estomático (MORGAN; POWELL, 1970; RAI; SHARMA; SHARMA, 1986; EINHELLIG, 2004).

Os taninos, conhecidos por sua importância para a defesa das plantas, apresentam outros mecanismos de ação. Sua ação sobre a membrana plasmática pode estar associada a redução na capacidade de absorção de água e também fechamento estomático (EINHELLIG, 1971, 2004). Em outro trabalho avaliando o efeito de taninos sobre plantas, Muthukumar, Sivaramakrishnan e Mahadevan (1985) reportaram reduções de clorofila e carotenóides das plantas tratadas, assim como inibição da germinação e o desenvolvimento e o alongamento da radícula de diferentes espécies alvo.

Os flavonóides correspondem a uma classe de compostos fenólicos que apresentam baixo número de substâncias com propriedades alelopáticas estudadas (EINHELLIG, 2004). Estas substâncias são conhecidas por alterarem o metabolismo de energia das células, inibindo a absorção de oxigênio pela mitocôndria e interferindo na produção de adenosina trifosfato (ATP) (MORELAND; NOVITZKY, 1988; STENLID, 1970). O trabalho de Einhellig (2004) cita vários trabalhos com resultados de inibição de germinação e desenvolvimento de plântulas de diferentes espécies a partir da administração de flavonóides.

A catequina, entre outros flavonóides, já demonstrou efeito também sobre os cloroplastos e na inibição da fosforilação. Catequina, epicatequina e rotenona, que foram identificados em extratos de *E. plana* (KLEIN, 2015), e atuam na mitocôndria, inibem a absorção de oxigênio, interferindo na produção de ATP e no transporte de elétrons. Acredita-se que os flavonóides possuam outros mecanismos de ação, ainda desconhecidos (EINHELLIG, 2004). A catequina é uma das substâncias produzidas por *Centaurea maculosa*, uma planta daninha perene nativa do continente europeu que é invasora de pastagens e campos nos Estados Unidos. Seu efeito foi estudado no solo e em outras espécies, sendo responsabilizada por parte do sucesso na invasibilidade de *C. maculosa* na América do Norte a partir de

reações que culminam desencadeando estresse oxidativo nas plantas alvo (BAIS et al., 2003). Além disso, plantas desta espécie parecem produzir maiores quantidades de catequina como resposta a situações de estresse, como o ataque de artrópodes herbívoros, resultando em maior efeito sobre espécies alvo (THELEN et al., 2005).

O fato do capim-annoni-2 produzir diversos compostos fenólicos com efeito alelopático variável sobre diferentes espécies alvo, os quais apresentam diversos mecanismos de ação (com a maioria ainda pouco conhecidos), dificulta prever seu comportamento no ambiente e nas plantas alvo. Por isso, estudos futuros investigando os mecanismos de ação de determinados compostos fenólicos em plantas alvo (tanto individualmente quanto em conjunto), bem como as suas relações com o ambiente podem elucidar muitas questões que ainda se encontram sem resposta. Além de contribuir para a ciência dos mecanismos de ação de produtos naturais de plantas, este conhecimento será fundamental para melhorar a utilização, por exemplo, de extratos de plantas como bioherbicidas ou para viabilizar a utilização de produtos naturais como modelos para a síntese de novos herbicidas.

3 ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO E EMERGÊNCIA DE CAPIM-ANNONI-2

RESUMO

Eragrostis plana é uma espécie gramínea perene estival de verão não nativa do Brasil que se tornou uma planta invasora importante nas pastagens da região Sul da América do Sul. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a influência de fatores ambientais na germinação e na emergência da plântula. Foram conduzidos seis experimentos, todos em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, utilizando 50 sementes de *E. plana* por unidade experimental. Nos experimentos de germinação foram avaliadas as variáveis plântulas normais, plântulas anormais, sementes quiescentes, mortalidade e índice de velocidade de germinação, enquanto que para o experimento de emergência foi avaliada a variável emergência. Sementes germinaram em temperaturas constantes de 15 até 40 °C, mas o percentual de germinação foi maior que 94% apenas com temperaturas alternadas. As sementes completaram o processo de germinação em menos de cinco dias com 35/20 °C. A exposição a luz aumentou a porcentagem de plântulas normais em 11 %. A germinação aumentou de 0 para 98 % com o aumento do potencial de água de -1,2 para 0 MPa e 87 % das sementes não germinadas nos tratamentos entre -0,4 e -1,2 MPa germinaram após a remoção da condição de restrição de água. A germinação foi maior ou igual a 90 % nas concentrações de cloreto de sódio até 120 mM, mas a frequência de plântulas normais decresceu progressivamente com o aumento na concentração. O maior percentual de emergência (87 %) foi observado nas sementes dispostas na superfície do solo, enquanto não houve germinação na profundidade de 4 cm. Este conjunto de informações indicam que a germinação e a emergência podem ocorrer em uma ampla variedade de condições. Entretanto, estratégias de manejo de *E. plana* devem considerar a redução na exposição das sementes as condições que favorecem a germinação, como a exposição à radiação, flutuação diária de temperatura e condições de umidade. Medidas de manejo podem incluir a cobertura do solo ou revolvimento.

Palavras-chave: *Eragrostis plana* Nees. Temperatura. Estresse hídrico. Estresse salino. Profundidade de enterrio de semente.

ABSTRACT

Eragrostis plana is a warm-season perennial grass non-native to Brazil and has become a serious weed in pasture lands of Southern South America. The objective of this work was to evaluate the influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence. Six experiments were conducted, all in a completely randomized design with 4 replicates, using 50 seeds of *E. plana* per experimental unit. In the germination experiments, the variables normal seedlings, abnormal seedlings, quiescent seeds, mortality and germination speed index were evaluated, whereas for the emergence experiment the emergence was evaluated. Seeds germinated at constant temperatures from 15 up to 40 °C, but germination percentages were higher than 94 % only at alternate temperatures. Seeds completed the germination process in less than five days at 35/20 °C. Light exposure boosted normal seedling frequency by 11 %. Germination increased from 0 to 98 % as water potential increased from -1.2 to 0 MPa, and 87% of the ungerminated seeds from -0.4 to -1.2 MPa germinated after

the removal of the water restriction condition. Germination was equal or higher than 90% at sodium chloride concentrations up to 120 mM, but normal seedling frequency decreased progressively along concentration increase. The highest emergence rate (87 %) was observed with seeds placed on the soil surface, while no emergence occurred at a depth of 4 cm. This set of information indicates that germination and emergence can occur over a wide range of conditions. Nevertheless, management strategies for *E. plana* must consider reducing the exposition of the seeds to germination triggering factors, such as exposition to radiation, diurnal temperature variation and moisture conditions. Measures may include soil cover or ploughing.

Keywords: *Eragrostis plana* Nees. Temperature. Water stress. Saline stress. Seed depth.

3.1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma gramínea perene estival de verão com fotossíntese tipo C4 (BOTH, 1992) que se reproduz por sementes. Seu centro de origem é o Sul do continente africano (BRINK; BELAY, 2006) e foi introduzida no Brasil na década de 1950 (MEDEIROS; SAIBRO; FOCHT, 2009). A região de pastagens localizada na região Sul da América do Sul constitui uma zona de produção pecuária importante onde o capim-annoni-2 se tornou uma planta invasora dominante nas décadas recentes (ZENNI; ZILLER, 2011). No Brasil a área invadida já supera um milhão de hectares, apesar das políticas para conter sua expansão (MEDEIROS; PILLAR; REIS, 2004) e a invasão continua em direção a países vizinhos na região.

Antes do reconhecimento de *E. plana* como invasora, a planta foi comercializada e cultivada no Brasil devido a sua resistência ao pisoteio, geada e a seca. Entretanto, esta espécie apresenta baixo valor como forragem devido a sua baixa palatabilidade e qualidade nutricional (QUATTROCCHI, 2012). Seu alto conteúdo de fibras também acelera o desgaste da dentição dos animais, reduzindo sua performance alimentar (FERREIRA, 2011). A combinação destes fatores, mais a dificuldade no manejo das populações de capim-annoni-2, explicam porque as pastagens infestadas apresentam rentabilidade e valores de terra reduzidos.

A semente de capim-annoni-2 tem dormência secundária que pode ser interrompida com o frio (MACEDO, 1993). O estágio vegetativo ocorre durante as estações quentes, quando a máxima taxa de assimilação de CO₂ (25,88 μmol m⁻² s⁻¹) pode ser observada a 30 °C (BOTH, 1992). A planta apresenta inflorescência complexa, com sementes do tipo cariopses de 1,5 mm de comprimento (CLAYTON et

al., 2006). O tamanho diminuto das sementes facilitam o seu transporte e movimentação na superfície e no perfil do solo, onde pode permanecer viável por vários anos (MEDEIROS et al., 2014).

Espécies de plantas alóctones são frequentes invasoras de pastagem e campos (BAKER, 1986). A invasão de campos por plantas invasoras pode ser facilitada pela intensificação no uso agrícola (MARSHALL, 2002), evento que tem sido observado na região Sul do Brasil nas décadas recentes. Adicionalmente, há uma baixa preferência do gado pela parte aérea do capim-annoni-2, permitindo que a planta se desenvolva, floresça e produza sementes (FERREIRA; MEDEIROS; FAVRETO, 2008). Durante períodos de baixa disponibilidade de forragem, os animais se alimentam das panículas de *E. plana*, auxiliando na disseminação das sementes (FOCHT; MEDEIROS, 2012).

Informações da ecologia da germinação do capim-annoni-2 são escassos na literatura científica. Devido ao fato dos estádios iniciais de desenvolvimento serem críticos para o estabelecimento de populações de plantas invasoras, o conhecimento dos requerimentos ecológicos para a germinação e emergência do capim-annoni-2 podem contribuir para a melhoria do seu manejo. Os objetivos deste estudo foram: avaliar os requerimentos para germinação de *E. plana*, especificamente da temperatura, exposição a luz, potencial osmótico e salinidade; além de determinar os padrões de emergência de plântulas em diferentes profundidades de solo.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e preparação de semente

Em abril de 2015 foram coletadas panículas de 200 indivíduos de uma população de *E. plana* em uma área de 20 hectares localizada em Abelardo Luz (SC) (coordenadas: -26.527820, -52.255808). A área, cultivada com braquiária brizanta (*Urochloa brizantha*), foi recentemente invadida por *E. plana*. As panículas coletadas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, modelo 400 marca Ethiktechnology antes de as sementes serem removidas, e posteriormente armazenadas em refrigerador em temperatura de 10 ± 2 °C até serem utilizadas sete meses depois. Um dos objetivos da armazenagem em refrigerador foi a necessidade de quebra de dormência. Exsicatas de duas plantas foram confeccionadas para

identificação e depósito no herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Pato Branco sob o registro HPB 1102. Experimentos, iniciados em novembro de 2015, foram conduzidos em câmaras de crescimento com controle de temperatura e fotoperíodo modelo BF2 CGFP 295 marca Biofoco no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul.

3.2.2 Efeito de temperaturas contínuas na germinação

A germinação de *E. plana* foi avaliada em temperaturas contínuas dispondo 50 sementes, distribuídas uniformemente em caixa de germinação (Gerbox, 11 x 11 cm). As caixas foram preparadas com duas camadas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada em uma relação de 1:2 (m/m). As Gerbox foram então incubadas em câmaras de crescimento em temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C em ciclos dia/noite de 12:12 horas. Lâmpadas fluorescentes foram utilizadas para produzir uma irradiância de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A umidade foi mantida constante pela suplementação da água perdida por evaporação. As sementes foram consideradas germinadas quando a radícula rompeu o tegumento da semente e tornou-se visível com a utilização de estéreo microscópio binocular. Foram realizadas avaliações diárias desde a primeira protusão de radícula para registrar o número de plântulas normais até o período de estabilização da germinação. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo com a equação de Maguire (MAGUIRE, 1962) para estimar o vigor (Equação 3.1):

$$\text{IVG} = (N_1/T_1) + (N_2/T_2) + \dots + (N_n/T_n) \quad [3.1]$$

Em que: N é o número de sementes germinadas no intervalo da primeira, segunda e enésima contagem e T é o tempo em dias da primeira, segunda e enésima contagem, respectivamente.

A taxa de germinação cumulativa foi determinada para cada uma das temperaturas considerando o número de sementes germinadas em cada período de avaliação após a disposição das sementes para iniciar o teste de germinação. As temperaturas cardinais foram estimadas utilizando a abordagem clássica (DERAKHSHAN et al., 2014), resumida como: em cada temperatura, os dados foram normalizados para 100% da germinação e posteriormente ajustados a equação

sigmoidal logística de três parâmetros. As taxas para 50 % da germinação foram calculadas para cada termo período utilizando o inverso do X_{50} obtido pela equação sigmoidal. Temperaturas de germinação máxima e mínima foram estimadas por modelos lineares, calculando o valor de intercepto de cada curva de regressão com a abcissa. A temperatura ótima de germinação para *E. plana* foi determinada à partir do intercepto das duas curvas de regressão, utilizando os interceptos e o declive das duas equações de regressão (DUMUR; PILBEAM; CRAIGON, 1990). Outras variáveis determinadas no 14º dia após a semeadura incluem plântulas normais, plântulas anormais, sementes quiescentes e sementes mortas. Sementes que não germinaram após as temperaturas descritas acima, mas permaneceram firmes e mantiveram sua cor, foram consideradas quiescentes.

3.2.3 Efeito de temperaturas alternadas na germinação

O efeito de temperaturas alternadas na germinação da semente de *E. plana* foi avaliado utilizando os mesmos procedimentos descritos no experimento anterior. A diferença foi que as sementes foram incubadas em três temperaturas alternadas (35/20, 30/20 e 35/15 °C) em regime de luz/escuro (12/12 h). Plântulas normais e anormais, sementes quiescentes e mortas foram contadas no sétimo dia após a semeadura.

3.2.4 Efeito da exposição a luz na germinação

A fotoblastia da semente de *E. plana* foi avaliada utilizando a maioria dos procedimentos já descritos nos experimentos anteriores. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em refrigerador a 10 ± 2 °C, em um recipiente coberto com papel alumínio para evitar a exposição a luz por 90 dias antes de serem utilizadas. Toda a manipulação das sementes foi realizada em uma sala escura, utilizando luz verde para prevenir a ativação do fitocromo. Para a germinação no escuro, as Gerbox foram envolvidas com duas camadas de papel alumínio. As Gerbox foram incubadas em temperatura alternada (35/20 °C) em regime de luz/escuro (12/12 h). As tampas das Gerbox foram seladas com filme plástico (Parafilm M®) para evitar a perda de água durante o período de incubação. Plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas foram contadas no sétimo dia após a semeadura.

3.2.5 Efeito da disponibilidade de água na germinação

O efeito da restrição hídrica sobre a germinação da semente de *E. plana* foi avaliado com os mesmos procedimentos descritos anteriormente, exceto pela restrição hídrica que foi simulada utilizando diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Foi empregada temperatura alternada de 35/20 °C. As Gerbox foram seladas entorno da tampa com filme plástico (Parafilm M®) para evitar a perda de água durante o período de incubação. O potencial osmótico (ψ_s) das soluções com PEG foi calculado à partir da concentração utilizada. As concentrações de PEG utilizadas foram equivalentes a ψ_s de 0,00, -0,05, -0,10, -0,20, -0,40, -0,80 e -1,20 MPa a 35 °C, respectivamente. O potencial osmótico da solução (ψ_s , em MPa) foi calculado adaptando a equação de Michel e Kaufmann (1973) (Equação 3.2):

$$\Psi_s = 0,1 * [-(1,18 * 10^{-2}) * C - (1,18 * 10^{-4}) * C^2 + (2,67 * 10^{-4}) * C * T + (8,39 * 10^{-7}) * C^2 * T] \quad [3.2]$$

Em que: C é a concentração em g kg⁻¹ de água destilada e T é a temperatura em °C. As variáveis foram plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas no sétimo dia após a semeadura.

As sementes não germinadas dos tratamentos com -0,40, -0,80 e -1,20 MPa foram secas em seus respectivos Gerbox a 25 °C por 72 h após o teste de germinação de sete dias. Após, as sementes foram colocadas em novos Gerbox preparados com duas camadas de papel mata borrão umedecidos com água destilada em uma relação de 1:2 (m/m). Plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas foram contadas sete dias após a ressemeadura.

3.2.6 Efeito da salinidade na germinação

A resposta da exposição da semente de *E. plana* à salinidade foi avaliada com os mesmos procedimentos descritos anteriormente, com exceção do estresse salino que foi simulado utilizando sete concentrações diferentes de cloreto de sódio (NaCl). Foi utilizada temperatura alternada (35/20 °C) na incubação. As sementes foram colocadas em Gerbox contendo soluções de NaCl de 0, 10, 20, 40, 80, 120 e 200 mM com duas camadas de papel mata borrão umedecidos com água destilada ou solução salina em uma relação de 1:2 (m/m). As Gerbox foram seladas entorno da tampa com filme plástico (Parafilm M®) para evitar a perda de água durante

o período de incubação. Plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas foram contadas sete dias após a ressemeadura.

3.2.7 Efeito da profundidade de enterrio da semente na emergência da plântula

Vasos (180 mL) com substrato receberam 50 sementes de *E. plana*. O substrato foi constituído de uma mistura de solo (latossolo vermelho distroférico) e areia com uma relação 2:1 (m/m). O solo foi autoclavado por 15 minutos, seco e passado em peneira de 1,7 mm antes de ser utilizado. As profundidades de semente foram 0 (superfície), 1, 2, 3 e 4 cm. O substrato foi umedecido para atingir 80% da capacidade de campo e a água perdida por evaporação foi repostada diariamente. Os vasos foram incubados em câmara de crescimento, modelo BF2 CGFP 295 marca Biofoco, com temperatura alternada (35/20 °C) e regime luz/escuro (12/12 h). Lâmpadas fluorescentes foram utilizadas para produzir uma intensidade de luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plântulas foram consideradas emergidas quando os folíolos se tornaram visíveis na superfície do substrato. As plântulas emergidas visíveis na superfície foram contadas até o 12º dia após a sementeira, quando ocorreu estabilização da emergência. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi utilizado a partir da adaptação do IVG, substituindo o número de sementes germinadas pelo número de plântulas emergidas.

3.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram analisados com o software estatístico Genes (CRUZ, 2013). Nos tratamentos qualitativos, as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ou teste F, após a análise de variância (Anova). Para os tratamentos quantitativos, quando significativo, foi aplicada a análise de regressão após a Anova, escolhendo-se o modelo mais simples, aos quais os dados apresentem bom ajuste, que produziu a previsão mais precisa e que resultou na menor soma de quadrados do resíduo.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da temperatura constante na germinação

A temperatura influenciou a germinação de *E. plana*, e a relação entre as temperaturas contínuas e a percentagem de germinação foi explicada por um modelo Gaussiano não-linear (Figura 3.1 A). Entre as temperaturas testadas, a menor germinação ocorreu a 15 °C, enquanto a maior (77 %) foi observada a 35 °C. Para as temperaturas contínuas, as temperaturas mínima, máxima e ótima para germinação foram 10,7, 45 e 36,6 °C, respectivamente. O total de plântulas anormais entre as temperaturas avaliadas foi menor que 1 % (dados não apresentados) e não diferiu entre os tratamentos.

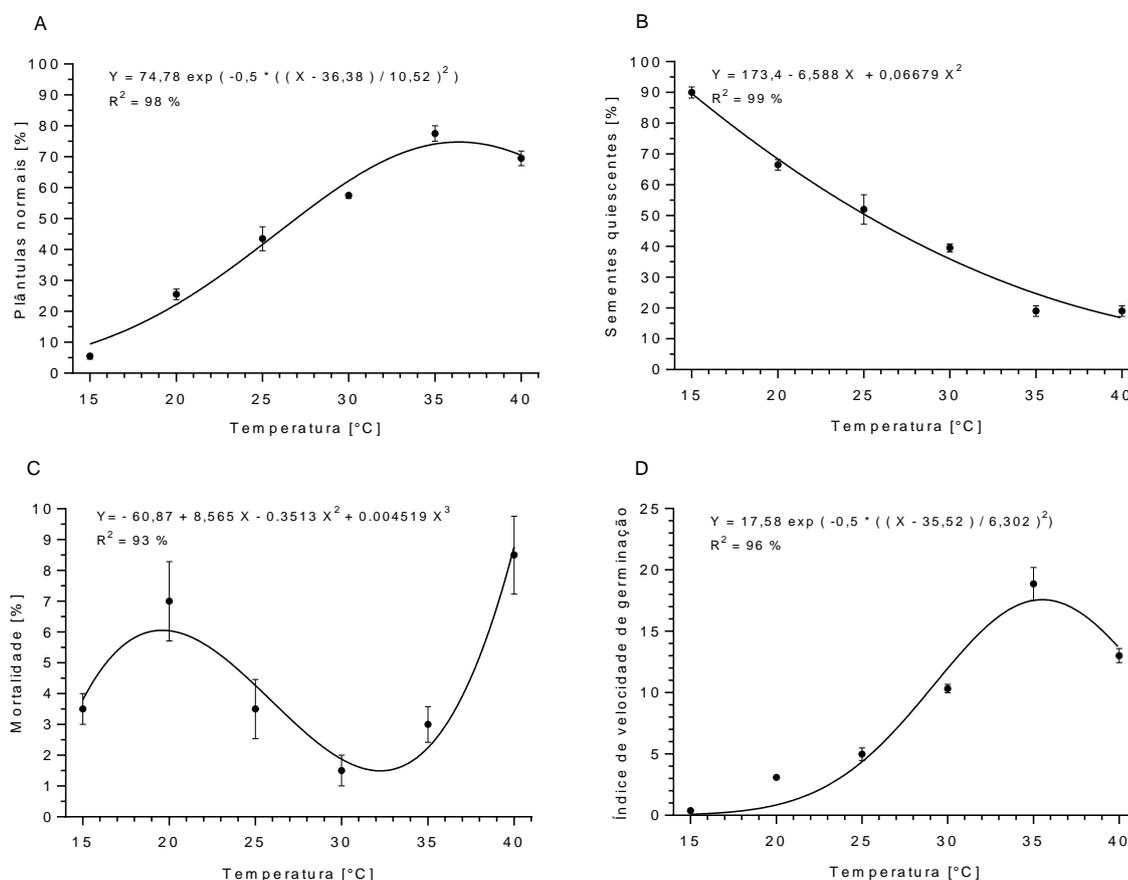


Figura 3.1 – Efeito de temperaturas contínuas em quatro variáveis de sementes de *Eragrostis plana* avaliadas no 14º dia após a sementeira. A – A curva representa um modelo Gaussiano, onde Y é a germinação (%) em determinada temperatura (°C) X. B – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é semente quiescente (%) em determinada temperatura (°C) X. C – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é a mortalidade (%) em determinada temperatura (°C) X. D – A curva representa um modelo Gaussiano não-linear, onde Y é o índice de velocidade de germinação (IVG) em determinada temperatura (°C) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Temperaturas abaixo de 30 °C diminuíram a germinação das sementes. A maior percentagem de sementes quiescentes (90 %) foi registrada a 15 °C. O total de sementes quiescentes diminuiu progressivamente até atingir 40 °C. A regressão entre as temperaturas constantes e a percentagem de sementes quiescentes foi ajustada em modelo polinomial não-linear de segunda ordem (Figura 3.1 B).

O menor índice de velocidade de germinação (IVG) ocorreu a 15 °C e o maior a 35 °C (Figura 3.1 D). Quanto menor a temperatura, maior foi a fase necessária para o rompimento do tegumento e disrupção da radícula. O modelo Gaussiano não-linear apresentou um bom ajuste para a regressão entre temperaturas constantes e IVG. O IVG a 35 °C foi aproximadamente 45 % maior que o segundo maior valor a 40 °C e quase 83 % maior que o terceiro, a 30 °C. Por estas razões, 35 e 30 °C foram as temperaturas escolhidas como temperaturas diurnas no experimento com temperaturas alternadas.

Estas respostas de *E. plana* a temperaturas contínuas apresentaram tendência semelhante aos resultados reportados para *E. tenuifolia*, principalmente devido a tendência de maior mortalidade abaixo de 20 e acima de 40 °C e ao maior percentual de sementes quiescentes a 15 °C (BITTENCOURT et al., 2016). Além disso, 20 °C parece prover estímulo suficiente para que as sementes iniciem o processo de germinação, mas esta não parece ser uma temperatura adequada para o desenvolvimento inicial das plântulas, assim como 40 °C. Todavia, a ampla faixa entre a basal e a máxima temperatura onde ocorreu germinação demonstra a habilidade da espécie para que as sementes não dependam de temperaturas específicas.

3.3.2 Efeito de temperaturas alternadas na germinação

Flutuações de temperatura de 10 (30/20 °C), 15 (35/20 °C) e 20 °C (35/15 °C) entre dia e noite resultaram em maiores percentuais de germinação que as observadas nas temperaturas contínuas. Em todos os tratamentos a germinação foi maior que 94 % e não diferiu entre as temperaturas alternadas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Influência das temperaturas alternadas nas plântulas normais e anormais, sementes quiescentes e mortas e no índice de velocidade de germinação de *Eragrostis plana* no sétimo dia após a sementeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Temperatura [°C] | Plântulas normais | Plântulas anormais | Sementes quiescentes | Mortalidade | IVG * |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| | [%] | | | | |
| 30/20 | 94,00 ± 1.83 ^{ns} | 0,50 ± 0,50 ^{ns} | 4,00 ± 1,83 ^{ns} | 1,50 ± 0,50 ^{ns} | 20,63 ± 0,31 b |
| 35/20 | 97,00 ± 1.29 ^{ns} | 1,00 ± 0,58 ^{ns} | 0,50 ± 0,50 ^{ns} | 1,50 ± 0,50 ^{ns} | 23,59 ± 0,39 a |
| 35/15 | 96,50 ± 0.96 ^{ns} | 1,00 ± 0,58 ^{ns} | 0,50 ± 0,50 ^{ns} | 2,00 ± 0,00 ^{ns} | 21,57 ± 0,43 a |

* Tratamentos com médias ± erro padrão não ligadas por mesma letra nas colunas diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$); ^{ns} Não significativo.

A germinação em 35/20 °C foi 19,5 % maior que em 35 °C. Apesar da ausência de diferença significativa entre os tratamentos para germinação, a temperatura 30/20 °C apresentou um índice de velocidade de germinação 12 % menor que o observado no tratamento 35/20 °C.

Considerando a distribuição da germinação das sementes no tempo a 35/20 °C, todas as sementes completaram a germinação até o quarto dia após a sementeira (Figura 3.2).

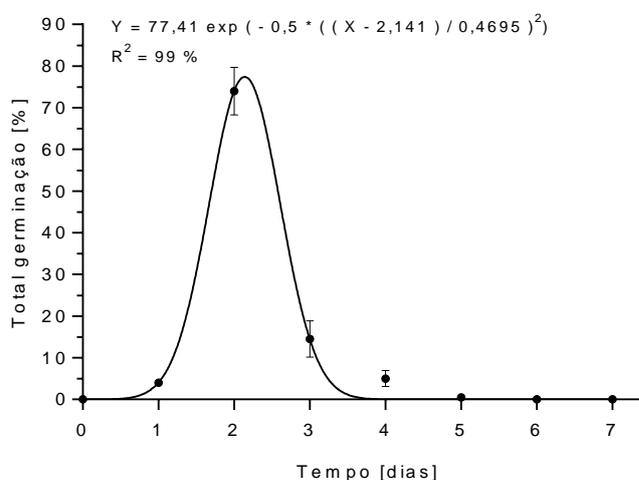


Figura 3.2 – Distribuição do total de sementes germinadas de *Eragrostis plana* na temperatura de alternada de 35/20 °C até o sétimo dia após a sementeira. A curva representa um modelo Gaussiano, onde Y é o total de sementes germinadas (%) em um certo tempo (dias) X. Os pontos representam as médias de quatro repetições com a barra representando os respectivos erros padrões. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A maior porcentagem de germinação registrada nas temperaturas alternadas comparada às temperaturas contínuas demonstra que a oscilação é um fator determinante, agindo como estímulo ou gatilho para disparar o processo de

germinação das sementes de *E. plana*. Da mesma forma, trabalho realizado com *E. tenuifolia* também registrou maiores percentuais de germinação em temperaturas alternadas quando comparadas às temperaturas contínuas (BITTENCOURT et al., 2016). Isto talvez possa ser explicado pelo importante papel da oscilação da temperatura entre o dia e a noite na regulação transcricional de uma série de enzimas responsáveis pela síntese e degradação do ácido abscísico e também pela ativação ou degradação de giberelina em várias espécies vegetais (HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008). Esta dinâmica, provavelmente ocasiona um balanço entre estes dois hormônios, que é essencial para o processo de germinação (PENFIELD; HALL, 2009).

3.3.3 Efeito da exposição a luz na germinação

A exposição à luz influenciou positivamente a germinação das sementes de *E. plana* (Tabela 3.2). De fato, a germinação das sementes expostas à luz foi 10 % superior às que foram mantidas no escuro. O total de sementes quiescentes do tratamento com luz foi 11,5 % inferior ao escuro.

Tabela 3.2 – Influência da exposição a luz sobre plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas de *Eragrostis plana* no sétimo dia após a sementeira. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Condição | Plântulas | Plântulas | Sementes | Mortalidade |
|----------|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| | normais | anormais | quiescentes | |
| [%] | | | | |
| Luz | 94.50 ± 1.50 * | 1.50 ± 0.96 ^{ns} | 1.00 ± 0.58* | 3.00 ± 0.58 ^{ns} |
| Escuro | 84.50 ± 2.50 * | 1.00 ± 0.58 ^{ns} | 12.50 ± 1.89 * | 2.00 ± 1.41 ^{ns} |

* Tratamentos com médias ± erro padrão diferem pelo teste F ($p < 0.05$); ^{ns} Não significativo.

A diferença na germinação entre os ambientes com e sem luz sugere uma sensibilidade das sementes de *E. plana* à luz. A sensibilidade de sementes de *E. tenuifolia*, em outro trabalho, foi maior do que a observada para *E. plana* (BITTENCOURT et al., 2016). Outros pesquisadores observaram que espécies com sementes de tamanho pequeno apresentaram maior fotoblastia do que sementes de tamanho grande; uma característica que diminui com o aumento da massa da semente (GRIME et al., 1981). A detecção da luz pelas sementes é mediada por moléculas chamadas fitocromos, que desempenham um papel importante na germinação das sementes (SHINOMURA, 1997). As respostas das sementes à luz

são importantes para prevenir a germinação de *E. plana* em condições desfavoráveis ao estabelecimento e desenvolvimento das plantas.

3.3.4 Efeito da disponibilidade hídrica na germinação

O potencial hídrico apresentou efeito significativo sobre a percentagem de sementes germinadas e quiescentes. A maior germinação (98 %) foi observada na ausência de restrição hídrica, decrescendo progressivamente com a redução no potencial osmótico (Figura 3.3).

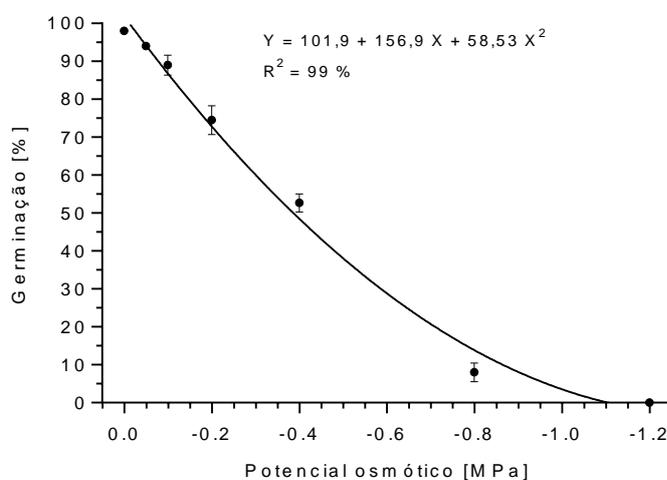


Figura 3.3 – Germinação de sementes de *Eragrostis plana* em resposta a diferentes potenciais osmóticos no sétimo dia após a semeadura. A curva representa um polinomial de segunda ordem, onde Y é o total de sementes germinadas (%) em determinado potencial osmótico (MPa) X. Os pontos representam as médias de quatro repetições com a barra representando os respectivos erros padrões. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Em um novo ambiente, sem restrição hídrica, as sementes recuperadas dos tratamentos -0,40, -0,80 e -1,20 MPa, atingiram os pontos máximos de plântulas normais nesta mesma ordem (Tabela 3.3.). Houve relação inversamente proporcional entre o potencial osmótico no qual as sementes foram submetidas no experimento anterior e o tempo necessário para atingir a germinação máxima no experimento sem restrição hídrica.

Entretanto, a Anova não identificou diferença significativa de percentuais de plântulas normais entre tratamentos com diferentes potenciais osmóticos de sementes submetidas a nove dias de restrição hídrica no primeiro experimento. Além

disso, não houve diferença entre estes tratamentos para as variáveis plântulas anormais e sementes quiescentes e mortas (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Influência de nove dias de restrição hídrica sobre a percentagem de plântulas normais e anormais e sementes quiescentes e mortas de *Eragrostis plana* no sétimo dia após a ressemeadura. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Potencial osmótico anterior [MPa] | Plântulas normais | Plântulas anormais | Sementes quiescentes | Sementes mortas |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | [%] | | | |
| -0,40 | 91,73 ± 3.56 ^{ns} | 2,68 ± 0,96 ^{ns} | 5,58 ± 2,74 ^{ns} | 0,00 ± 0,00 ^{ns} |
| -0,80 | 91,29 ± 1.03 ^{ns} | 2,74 ± 1,40 ^{ns} | 3,79 ± 1,02 ^{ns} | 2,18 ± 0,93 ^{ns} |
| -1,20 | 87,38 ± 2.08 ^{ns} | 3,53 ± 1,52 ^{ns} | 8,08 ± 0,83 ^{ns} | 1,01 ± 0,58 ^{ns} |

^{ns} Não significativo.

O estresse hídrico é um importante fator limitante para a germinação de sementes em *E. plana*. A diminuição na germinação ocasionada pela redução no potencial osmótico da solução era esperada porque a absorção de água e hidratação do tecido são essenciais para uma sequência ordenada de eventos metabólicos que resultam em desenvolvimento embrionário e crescimento da plântula (MARCOS FILHO, 2005). A restrição de água necessária para redução de 50 % da germinação máxima foi estimada a aproximadamente -0,4 MPa. Em um ensaio com forrageiras de verão, *Urochloa brizantha* apresentou uma redução na germinação máxima de 50 % em potencial hídrico de -0,5 MPa (GARCIA et al., 1998). Em outro estudo, realizado com 15 espécies vegetais, verificou-se que sementes de espécies adaptadas a ambientes áridos apresentaram dificuldade em germinar sob baixo potencial hídrico, sugerindo que isto pode ser resultado de um mecanismo evolucionário para prevenir a exposição das plântulas a ambientes desfavoráveis (EVANS; ETHERINGTON, 1990). Adicionalmente, mesmo depois de sofrer o impacto de restrição de água, que preveniu a conclusão do processo de germinação, sementes de *E. plana* permaneceram ativas fisiologicamente, apresentando um potencial de germinação semelhante aos observado no experimento de temperaturas alternadas sem restrição de água. Esta habilidade, para germinar após um período de estresse hídrico, demonstra uma resiliência das sementes da espécie à dessecação.

3.3.5 Efeito da salinidade na germinação

A salinidade afetou a germinação, o número de plântulas normais e anormais e as sementes quiescentes. Entretanto, a salinidade não influenciou a mortalidade, que permaneceu entre 1 e 3 % para todos os tratamentos (dados não apresentados). A maior percentagem de germinação (> 90 %) ocorreu entre 0 e 120 mM de NaCl, que diferiram significativamente de 200 mM (Figura 3.4 A). A ausência de salinidade (0 mM) resultou em percentagem de germinação 44 % maior comparada à concentração de 200 mM.

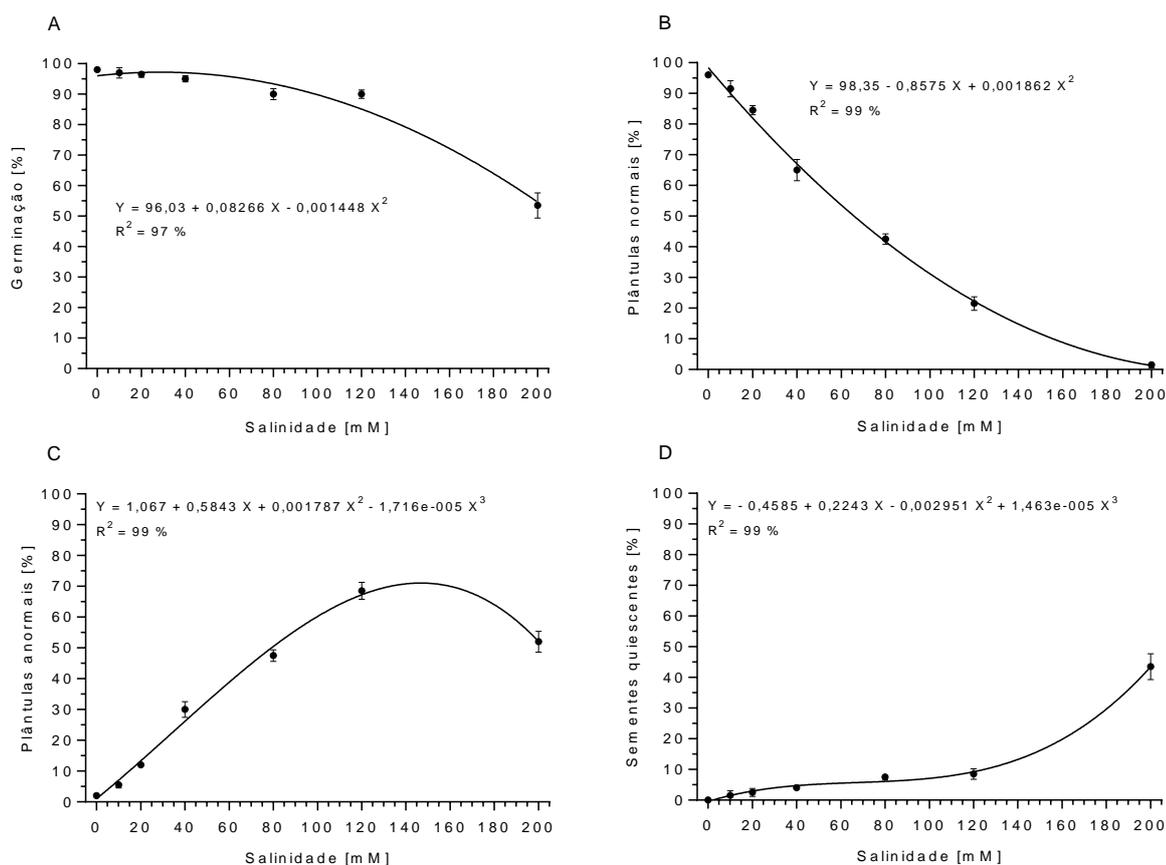


Figura 3.4 – Efeito da salinidade (concentração de NaCl) em quatro variáveis de sementes de *Eragrostis plana* no 7º dia após a semeadura em temperatura alternada (35/20 °C). A – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é a germinação (%) em determinada salinidade (mM) X. B – A curva representa um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y é plântulas normais (%) em determinada salinidade (mM) X. C – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é plântulas anormais (%) em determinada salinidade (mM) X. D – A curva representa um modelo polinomial de terceira ordem, onde Y é a semente quiescente (%) em determinada salinidade (mM) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A percentagem de plântulas normais foi maior (> 90 %) entre 0 e 10 mM de NaCl, decrescendo progressivamente com o aumento da concentração até 200

mM (Figura 3.4 B). A concentração necessária para reduzir a percentagem máxima de plântulas normais (96 %) em 50% foi estimada por interpolação em 69 mM. A maior percentagem de plântulas anormais foi registrada em 144 mM (Figura 3.4 C), enquanto a solução de 200 mM resultou na maior percentagem de sementes quiescentes (40 %) (Figura 3.4 D).

Sementes de *E. plana* toleram a presença de NaCl, que somente reduz a sua germinação em concentrações superiores a 120 mM. Esta característica permite às plantas colonizarem solos salinos, constituindo um atributo importante para algumas espécies, como *Emex spinosa* e *E. australis* (JAVAID; TANVEER, 2014). O aumento na frequência de plântulas anormais com o aumento da concentração de NaCl pode ser explicado pelo efeito osmótico e tóxico do sal nas sementes de *E. plana*, que reduz a disponibilidade de água para as sementes e aumenta a entrada de íons tóxicos nos tecidos embrionários (LIMA et al., 2005).

3.3.6 Efeito da profundidade de semeadura na emergência de plântulas

A emergência de plântulas de *E. plana* foi influenciada pela profundidade na qual foram enterradas (Figura 3.5). A emergência máxima (87 %) ocorreu no menor período de tempo (6 dias) quando as sementes foram dispostas na superfície (0 cm).

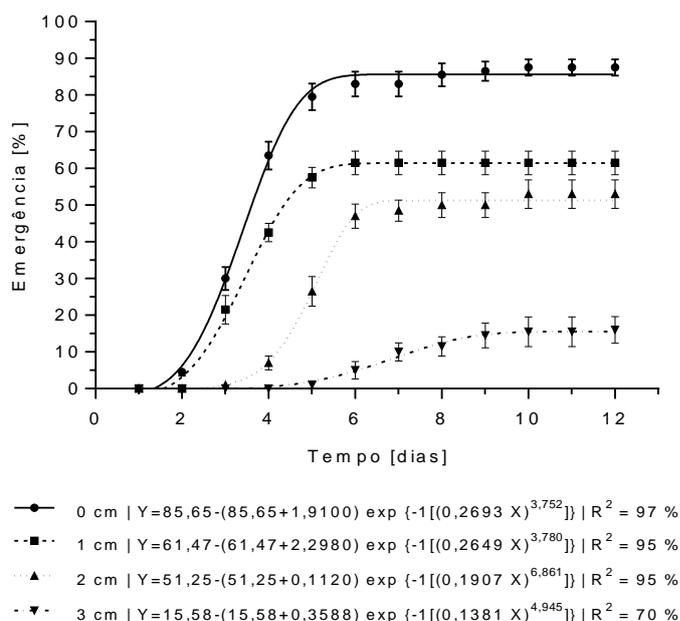


Figura 3.5 – Emergência cumulativa de *Eragrostis plana* em temperatura alternada (35/20 °C) em diferentes profundidades de enterrio das sementes (0, 1, 2 e 3 cm) até o 12º dia após a semeadura. As curvas correspondem a modelos não lineares de Weibull, onde Y é a emergência de plântulas (%) em um certo tempo (dias) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

No sétimo dia após a semeadura, o total de plântulas emergidas decresceu linearmente com o aumento na profundidade de enterrio das sementes, não tendo sido registrada emergência a 4 cm. Uma redução de 50 % na emergência é estimada, por interpolação, para ocorrer aproximadamente em 2 cm (Figura 3.6).

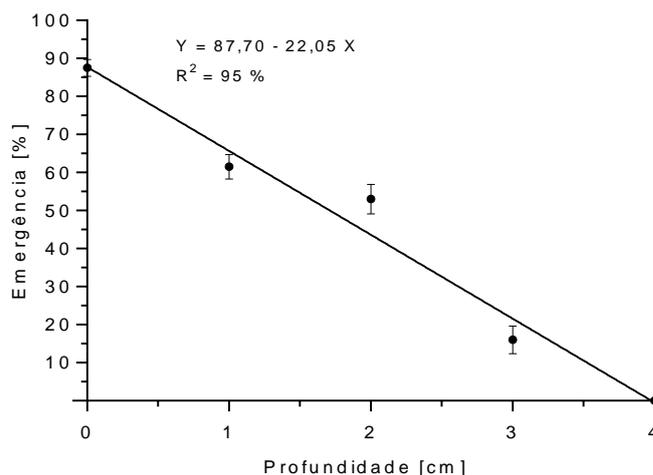


Figura 3.6 – Emergência de *Eragrostis plana* em temperatura alternada (35/20 °C) em diferentes profundidades de enterrio das sementes (0, 1, 2, 3 e 4 cm) no 12º dia após a semeadura. A curva corresponde ao modelo polinomial de primeira ordem, onde Y é a emergência de plântulas (%) em determinada profundidade (cm) X. Pontos representam as médias dos tratamentos de quatro repetições com a barra representando o erro padrão correspondente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A emergência de plântulas de *E. plana* foi influenciada negativamente pelo aumento na profundidade de enterrio das sementes. A dificuldade das plântulas de *E. plana* para emergir de profundidades maiores que 3 cm pode ter sido ocasionada por pelo menos três fatores: redução na temperatura ou flutuação da temperatura, nutrientes de reserva limitados devido ao tamanho da semente e sensibilidade à luz devido a semente provavelmente reconhecer a razão entre os espectros de luz vermelho distante e vermelho.

Baseados nos resultados do trabalho, pode-se assumir que parte da dificuldade no manejo de *E. plana* advém da elevada viabilidade das sementes em ampla faixa de temperatura. Nesta perspectiva, medidas de manejo devem focar nos fatores ambientais que contribuem para produção, dispersão, germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, porque estes são componentes-chave no processo de estabelecimento e invasão da espécie. O revolvimento do solo deve ser uma das táticas utilizadas porque pode tanto estimular a germinação (para posterior controle) pela exposição das sementes a temperaturas alternadas na superfície do solo ou enterrá-las em uma profundidade na qual as plantas não consigam emergir. O uso de culturas de cobertura ou *mulching* pode ser outra técnica de manejo útil, pois permite reduzir a amplitude térmica do solo. Além disso, a cobertura do solo limita o total e a qualidade da luz que incide na superfície do solo, consequentemente

reduzindo a germinação. Finalmente, parece importante prevenir a alimentação do banco de sementes armazenados no solo.

3.4 CONCLUSÕES

As sementes de *Eragrostis plana* apresentam maiores percentagens de germinação em temperatura alternada de 35/20 °C e com exposição à luz.

Um estresse hídrico moderado, de -0,40 MPa, reduz a germinação das sementes em 50 %.

A ocorrência de plântulas normais é reduzida com o aumento da salinidade.

A emergência de plântulas é inversamente relacionada à profundidade de enterrio da semente, não sendo observada a emergência na profundidade de 4 cm. Isto é resultado tanto do tamanho reduzido da semente quanto da sua sensibilidade a luz.

4 FITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DO CAPIM-ANNONI-2 E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

RESUMO

A espécie *Eragrostis plana*, que é conhecida popularmente como capim-annoni-2, é uma gramínea exótica que tem ocasionado problemas como planta invasora das pastagens da região Sul do Brasil nas últimas décadas. O presente trabalho tem por objetivo contribuir com o estudo fitoquímico, com enfoque alelopático, dos extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2. Os extratos brutos foram obtidos a partir do processo de extração exaustiva da fitomassa seca da parte aérea de plantas de capim-annoni-2, utilizando hexano, acetato de etila, álcool metílico e água em ordem crescente de polaridade. O bioensaio para determinação da fitotoxicidade dos extratos sobre plântulas de alfafa e trigo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, totalizando 40 Gerbox contendo 10 plântulas. Foram utilizados extratos brutos na concentração de 1 %, dissolvidos em solução de água destilada e polissorbato 20 na concentração de 4 % (v/v). A identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os extratos brutos de acetato de etila e metanólico apresentaram maior fitotoxicidade geral sobre alfafa e trigo, em comparação à testemunha com água destilada. Os extratos brutos diferiram entre si nos efeitos sobre as variáveis comprimento de radícula, de hipocótilo e total de plântulas de alfafa e trigo. Os extratos acetato de etila, metanólico e aquoso reduziram o comprimento total de plântulas de alfafa, mas o extrato acetato de etila foi aquele que reduziu em maior proporção o comprimento total de plântulas de trigo, em relação à testemunha. O extrato aquoso apresentou efeito inibitório sobre plântulas de alfafa e estimulatório sobre plântulas de trigo. No total, foram identificados e quantificados nove compostos fenólicos nos extratos brutos: ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, resveratrol e rutina. O ácido gálico foi identificado apenas no extrato acetato de etila, enquanto o resveratrol apenas no extrato aquoso e os ácidos caféico e cumárico foram identificados tanto no extrato metanólico quanto no extrato aquoso. A concentração de ácido vanílico nos extratos apresentou correlação inversamente proporcional ao comprimento de radícula de plântulas de alfafa.

Palavras-chave: *Eragrostis plana* Nees. *Medicago sativa* L. cv. Monarca. *Triticum aestivum* L. cv. IPR Catuara. Extratos brutos. Aleloquímicos.

ABSTRACT

The *Eragrostis plana* species, commonly known as South African lovegrass, is an exotic plant that has caused problems as an invasive weed of pastures of Southern Brazil in recent decades. This work aims to contribute to the phytochemical studies, with allelopathic approach, of the crude extracts of the shoots of South African lovegrass plants. The crude extracts were obtained from an exhaustive extraction process from dry shoots of South African lovegrass plants using hexane, ethyl acetate, methyl alcohol and water, in an increasing order of polarity. The bioassay to determine the phytotoxicity of the extracts on alfalfa and wheat seedlings was conducted in a completely randomized design, with four replicates, totalizing 40 Gerbox containing 10

seedlings. Crude extracts at 1 % concentration dissolved in a solution of distilled water with polysorbate 20 at 4 % concentration (v / v), were used. The identification and quantification of the phenolic compounds in the extracts was performed using high performance liquid chromatography. The extracts that caused most general phytotoxicity in alfalfa and wheat seedlings when compared to control with distilled water were ethyl acetate and methanolic. However, the crude extracts differed between themselves on the radicle, hypocotyl and total length reduction of alfalfa and wheat seedlings. While the ethyl acetate, aqueous and methanolic extracts expressed high phytotoxicity reducing total length of alfalfa seedlings, the ethyl acetate extract showed greater reduction of the total length of wheat seedlings. The aqueous extract presented an inhibitory effect on alfalfa seedlings and stimulatory on wheat. Nine phenolic compounds were identified and quantified in the crude extracts: caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, vanillic acid, catechin, epicatechin, resveratrol, and rutin. Gallic acid was identified only in the ethyl acetate extract, while resveratrol only in the aqueous extract and the caffeic and coumaric acid were identified in both the methanolic and aqueous extract. The concentration of vanillic acid in the extracts showed a correlation inversely proportional to the root length of alfalfa seedlings.

Keywords: *Eragrostis plana* Nees. *Medicago sativa* L. cv. Monarca. *Triticum aestivum* L. cv. IPR Catuara. Vegetable extracts. Ethyl acetate. Crude extracts. Allelochemicals. Allelochemicals.

4.1 INTRODUÇÃO

A ciência dos produtos naturais não constitui uma estrutura de conhecimento recente na história da humanidade, sendo que os primeiros registros sobre a utilização de plantas com propriedades medicinais foram realizados há mais de 2.000 anos a.C., desde os tempos da civilização sumério-acadiana (DOUGHARI, 2012). No entanto, esta prática ainda é muito empregada pela ciência moderna na busca por moléculas com propriedades bioativas para serem utilizadas na medicina e agricultura.

O processo de extração constitui um dos primeiros passos na avaliação de compostos bioativos de plantas (DAI; MUMPER, 2010). O processo de extração exaustiva sólido-líquido é um termo utilizado para designar a obtenção de substâncias de um tecido utilizando determinados solventes, sequencialmente, em ordem de polaridade. Este processo tem por objetivo a transferência de massa da parte sólida (amostra do tecido, por exemplo) para as partes líquidas (solventes) (HANDA, 2008).

O processo de extração de compostos de tecidos vegetais utilizando solventes é uma técnica antiga, realizado por diversas áreas da ciência e com diferentes propósitos. Independentemente da área de sua aplicação, visa tão somente

a extração e a separação de componentes químicos, em grupos, de acordo com a sua afinidade com os diferentes solventes empregados.

A partir deste processo, por exemplo, os extratos brutos podem ser testados em ensaios para avaliar a sua bioatividade, sofrer novos processos de separação ou ter seus componentes químicos identificados e quantificados pela utilização de diferentes técnicas espectrofotométricas. Grande parte dos estudos de produtos naturais inéditos ou de espécies de plantas pouco estudadas passa por esta sequência de trabalhos, para que as propriedades da espécie sejam melhor conhecidas, o que permite, inclusive, o descobrimento de novos mecanismos de ação herbicida em moléculas inéditas (TREZZI; SILVA, 2010).

Nos ensaios de alelopátia os extratos brutos normalmente são utilizados como uma das primeiras etapas visando identificar e quantificar compostos com caráter herbicida. Os extratos de diferentes polaridades geralmente são testados quanto à sua fitotoxicidade antes de sofrerem fracionamento por meio de técnicas cromatográficas, seguido de agrupamento dos compostos similares para posterior novo ensaio de fitotoxicidade. Na sequência, é possível realizar a purificação, identificação e ensaios de fitotoxicidade dos compostos isolados (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

Os procedimentos realizados após o processo de extração são organizados de forma a facilitar a compreensão da influência dos extratos e dos aleloquímicos nos ensaios de fitotoxicidade. O cruzamento das informações obtidas nas diferentes etapas descritas anteriormente permite aumentar a segurança das conclusões nos trabalhos com alelopátia (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). Mesmo constituindo uma etapa inicial que utiliza metodologias simples, a avaliação da fitotoxicidade dos extratos brutos é importante para espécies ainda pouco estudadas, podendo constituir uma das metodologias para a identificação do potencial alelopático de plantas (TREZZI; SILVA, 2010).

Por terem sido identificados compostos fenólicos com potencial efeito fitotóxico em extratos de capim-annoni-2 em trabalhos realizados por Favaretto et al. (2015a), espera-se que as frações mais polares dos extratos brutos contenham estes compostos. Se os compostos fenólicos justificarem a fitotoxicidade de capim-annoni-2, a fitotoxicidade dos extratos com solventes mais polares (metanólico e aquoso) deve ser maior que a dos extratos menos polares (hexânico). Isso porque os

compostos fenólicos tendem a apresentar maior afinidade com solventes que apresentam maior polaridade como álcool metílico e água, e até mesmo acetato de etila (média polaridade), quando comparados a hexano.

Assim, uma das hipóteses deste estudo é que os solventes com maior afinidade com os compostos fenólicos permitam obtenção de extratos brutos com elevada fitotoxicidade. Além disso, espera-se que esta fitotoxicidade possa ser justificada pela presença de compostos fenólicos, alguns já identificados em trabalhos anteriores, nos extratos metanólico e aquoso, como os ácidos cumárico, ferúlico e caféico e catequina e epicatequina. O presente trabalho tem por objetivo contribuir com o estudo fitoquímico do capim-annoni-2, com enfoque nos extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no ano de 2016 nos laboratórios de Fisiologia Vegetal e Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR); no laboratório de Plantas Daninhas, e, na Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco (PR).

4.2.1 Extração sólido-líquido

A fitomassa da parte aérea de 200 plantas de capim-annoni-2 foi coletada aleatoriamente em área infestada situada no município de Abelardo Luz (SC), no mês de janeiro de 2016. A área encontra-se nas coordenadas -26.527976, -52.255630, com altitude de aproximadamente 760 m. As plantas foram cortadas manualmente a 1 cm sobre a superfície do solo e a parte aérea amostrada foi mantida em congelador a -26 ± 2 °C até o momento de secagem. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar forçada microprocessada, modelo 400 marca Ethiktechnology a 40 °C até a estabilização da massa no mês de fevereiro de 2016. Logo após a secagem, a amostra foi moída em moinho tipo Wiley (tela de 2 mm) e acondicionada em frascos de vidro (4 L) com tampa lacrados com filme plástico (Parafilm®), para evitar troca de umidade com o ambiente externo.

Foram colocados 200 g da fitomassa seca e moída de capim-annoni-2 em Erlenmeyer com volume de 2 L. O Erlenmeyer foi recoberto com papel alumínio

para evitar a exposição à luz e colocado dentro de capela. O processo de extração exaustiva foi realizado com a utilização de solventes PA em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila, álcool metílico e água destilada. Cada solvente foi trocado três vezes em intervalos de 48 horas, com volume de 600 mL de solvente sendo adicionado em cada troca. O material vegetal foi separado do solvente a cada troca com uso de peneira.

A completa evaporação do solvente presente em cada extrato foi realizada utilizando-se evaporador rotativo modelo BT351 marca Biotech à 40 °C. As massas obtidas nos balões volumétricos utilizados para a roto evaporação dos solventes foram 3,99, 20,14, 22,23 e 16,35 g para os extratos hexânico, acetato de etila, metanólico e aquoso, respectivamente, utilizando balança modelo AUY220 marca Shimadzu®. Posteriormente, um volume conhecido dos extratos sem solvente foi utilizado para determinar a densidade e conseqüentemente o volume de cada extrato. Os volumes correspondentes às massas dos extratos acetato de etila, metanólico e aquoso, utilizados para a quantificação dos fenóis foi de 21,89, 24,03 e 13,29 mL, respectivamente.

4.2.2 Bioensaios para determinação de fitotoxicidade

Foram conduzidos dois bioensaios utilizando extratos brutos hexano, acetato de etila, álcool metílico e água na concentração de 1 % v/v em câmara de crescimento do tipo BOD, utilizando delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Um para avaliar o efeito dos extratos no desenvolvimento de plântulas de alfafa e outro em trigo.

A solubilização dos extratos brutos nos bioensaios de fitotoxicidade foi facilitada com uso de polissorbato 20 (Tween 20) à 4 %. Foram adicionados volumes de 12 mL dos extratos em concentração de 1 % (v/v) em cada Gerbox contendo duas folhas de papel mata borrão e 10 plântulas de *Medicago sativa* L. cv. Monarca ou *Triticum aestivum* cv. IPR Catuara, utilizando micropipetador modelo SVA-1000 marca Accumax®. Foram utilizadas plântulas de *M. sativa* com comprimento total entre 13 e 18 mm e de *T. aestivum* com comprimento de radícula entre 3 e 7 mm. Como controle foi utilizado tratamento com água destilada e Tween 20 à 4 %.

As caixas Gerbox foram seladas com fita plástica para evitar a perda de umidade e incubadas em câmaras tipo BOD modelo BF2 CGFP 295 marca Biofoco

com temperatura de 20 ± 1 °C e luminosidade de 12 horas por período de 48 horas. Após esse período, os comprimentos da radícula principal e do hipocótilo foram aferidos com a utilização de paquímetro digital modelo PDV1500 marca Vonder®.

4.2.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos brutos

Volume de 200 μ L do extrato bruto de cada amostra foi misturado a 1.800 μ L de álcool metílico grau espectroscópico Sigma-Aldrich®. As amostras foram então filtradas em filtro de membrana modelo PES 2204525 600C marca Analítica com poros de 0,45 μ m para posterior injeção de volume de 10 μ L de cada amostra no cromatógrafo líquido, modelo 920-R6 marca Varian®, equipado com coluna ACE® C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 μ m) conforme metodologia proposta por Silva (2016). Os padrões marca Sigma-Aldrich® com pureza igual ou superior a 99,9 % dos seguintes compostos foram injetados em conjunto no cromatógrafo líquido: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido salicílico, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, resveratrol e quercetina. A fase móvel foi utilizada em gradiente (Tabela 4.1), sendo composta por duas misturas de solventes: A) água e ácido acético (98:2) e B) água, ácido acético e acetonitrila (58:2:40). O sistema foi mantido a 30 °C com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

Tabela 4.1 – Gradiente de concentração de solventes da fase móvel utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da mistura B (água, ácido acético e acetonitrila - 58:2:40) em relação a A (água e ácido acético - 98:2) no tempo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Tempo [min] | Concentração B [%] |
|----------------|-----------------------|
| 0,1 | 5 |
| 2 | 20 |
| 15 | 25 |
| 25 | 85 |
| 30 | 85 |
| 32 | 95 |
| 33 | 95 |
| 36 | 5 |
| 45 | 5 |

Os tempos de retenção destes compostos foram registrados, sendo utilizados como referência para serem comparados com os picos nos cromatogramas das amostras de cada extrato. As concentrações dos compostos nas amostras foram

calculadas por interpolação das áreas dos picos dos cromatogramas com as curvas de calibração dos padrões. Os coeficientes de determinação (R^2) das equações de regressão linear dos padrões foram iguais ou maiores que 94 %.

4.2.4 Análise estatística

Os dados das variáveis comprimento de radícula, de hipocótilo e total de plântula foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$). Após anova, foi aplicado teste de comparação múltipla de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$). Utilizou-se o teste de Pearson para a análise de correlação entre os compostos fenólicos e as variáveis do teste de fitotoxicidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Genes (CRUZ, 2013).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ensaio de fitotoxicidade dos extratos brutos

Os extratos brutos reduziram o comprimento total de plântula, de radícula e de parte aérea das plantas alvo, nos bioensaios conduzidos com alfafa e trigo. Os extratos de acetato de etila, metanólico e aquoso resultaram nos menores comprimentos de radícula de alfafa, seguidos pelo extrato hexânico, que também reduziu o comprimento de radícula de alfafa em relação à testemunha. O comprimento de hipocótilo foi reduzido apenas pelos extratos acetato de etila e metanólico. O comprimento total de alfafa foi reduzido pelos extratos acetato de etila, metanólico e aquoso, diferindo da testemunha (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Comprimento de radícula, de hipocótilo e total (mm) de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*) incubados com diferentes extratos brutos de parte aérea de capim -annoni-2 em concentração de 1 % (v/v) por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Solvente | Alfafa | | | Trigo | | |
|------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | Radícula | Hipocótilo | Total | Radícula | Hipocótilo | Total |
| Hexano | 14,39 ± 0,54 b | 5,32 ± 0,36 a | 19,71 ± 0,67 a | 8,47 ± 0,75 c | 4,19 ± 0,26 c | 12,66 ± 0,98 b |
| Acetato de etila | 11,97 ± 0,08 c | 3,22 ± 0,12 b | 15,19 ± 0,19 b | 5,80 ± 0,15 d | 1,95 ± 0,05 d | 7,75 ± 0,18 c |
| Álcool metílico | 11,95 ± 0,52 c | 3,60 ± 0,23 b | 15,55 ± 0,70 b | 6,26 ± 0,22 d | 5,54 ± 0,21 b | 11,80 ± 0,42 b |
| Água | 12,73 ± 0,32 c | 5,23 ± 0,42 a | 17,96 ± 0,47 b | 20,13 ± 0,95 a | 5,64 ± 0,59 b | 25,78 ± 1,37 a |
| Testemunha | 16,81 ± 1,00 a | 5,06 ± 0,60 a | 21,87 ± 1,48 a | 17,64 ± 0,27 b | 7,72 ± 1,48 a | 25,36 ± 0,94 a |

* Tratamentos com médias ± erro padrão não ligadas por mesma letra nas colunas diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$).

Em estudo fitoquímico com extratos brutos de capim-annoni-2, Silva (2014) também identificou maior fitotoxicidade dos extratos metanólico e acetato de etila sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*. Em outro trabalho avaliando a fitotoxicidade dos extratos brutos de capim-annoni-2 obtidos com éter de petróleo e acetato de etila sobre *I. grandifolia*, Dalbosco (2013) verificou maior efeito fitotóxico do último sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas. Estes resultados, observados em plantas invasoras, foram similares àqueles observados no presente trabalho com os extratos brutos de capim-annoni-2 sobre plântulas de alfafa e trigo.

Os menores comprimentos de radícula de plântulas de trigo foram registrados nos extratos acetato de etila e metanólico, seguido do extrato hexânico. Já as maiores reduções no comprimento de hipocótilo foram registradas para o extrato acetato de etila, seguido do hexânico e por fim os extratos metanólico e aquoso. O comprimento total de trigo foi reduzido em maior escala em relação à testemunha pelo extrato acetato de etila, seguido pelos extratos hexânico e metanólico, inferiores à testemunha com água destilada e Tween 20.

Levando em consideração a redução do comprimento de radícula entre plântulas de trigo e de alfafa, os extratos acetato de etila e metanólico apresentaram as maiores reduções, seguidos do extrato hexânico. Já o extrato aquoso apresentou redução do comprimento da radícula de alfafa, mas o comprimento da radícula de trigo foi 10 % superior ao controle (Figura 4.1).

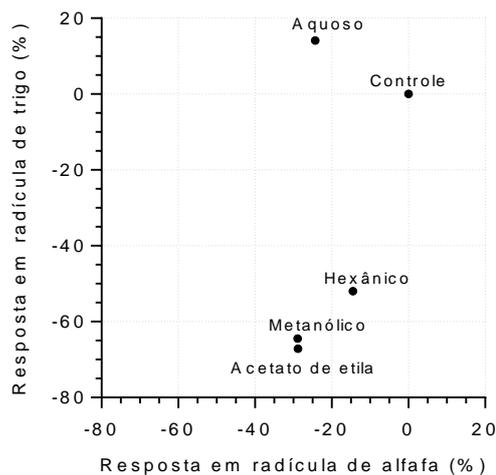


Figura 4.1 – Diferença percentual no comprimento de radícula de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

As maiores reduções no comprimento do hipocótilo em relação ao controle foram obtidas com o extrato acetato de etila, tanto para trigo quanto para alfafa. Os extratos com as segundas maiores reduções nos comprimentos de hipocótilo foram o extrato metanólico para a alfafa e hexânico para o trigo. Embora os extratos aquoso e hexânico tenham reduzido o comprimento de hipocótilo de trigo, estimularam aumento no comprimento de hipocótilo de alfafa em comparação à testemunha (Figura 4.2).

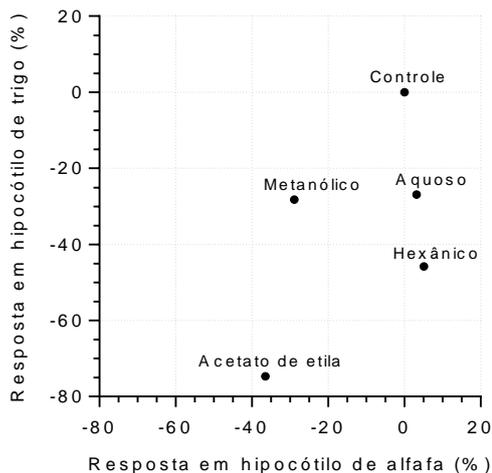


Figura 4.2 – Diferença percentual no comprimento de hipocótilo de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O comprimento total de alfafa e trigo foi reduzido em maior percentual com o extrato acetato de etila, seguido pelo extrato metanólico, em relação ao controle. O extrato hexânico reduziu o comprimento de trigo em aproximadamente 50 % e o de alfafa em 10 %. Já o extrato aquoso reduziu em quase 20 % o comprimento de alfafa, mas pouco influenciou o comprimento total de trigo, que foi semelhante ao obtido com a testemunha (Figura 4.3).

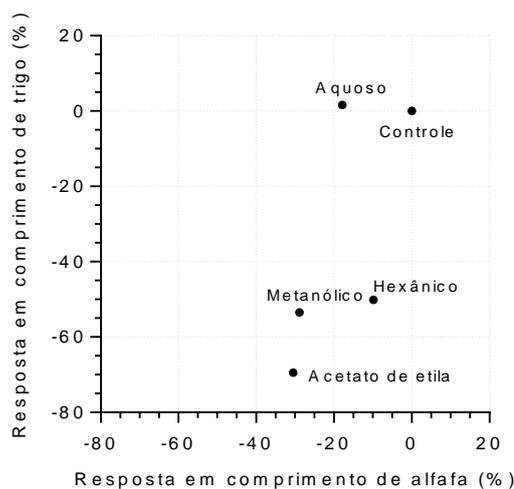


Figura 4.3 – Diferença percentual no comprimento total de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), em relação à testemunha, em função da utilização de extratos brutos a 1% v/v da parte aérea de capim-annoni-2 desenvolvidos por 48 horas a 20 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Levando em consideração o conjunto de resultados de fitotoxicidade, os extratos que demonstraram maior potencial de redução do desenvolvimento das plântulas das espécies estudadas foram acetato de etila e metanólico. O extrato hexânico, embora tenha apresentado fitotoxicidade para trigo, apresentou baixa fitotoxicidade em plântulas de alfafa. Já o extrato aquoso apresentou fitotoxicidade para alfafa, mas não para trigo, para o qual houve efeito estimulatório quando comparado à testemunha.

Em trabalho efetuado para avaliar a fitotoxicidade de extratos de *Canavalia ensiformis* na germinação e desenvolvimento de quatro espécies invasoras, em condições similares também demonstrou relação análoga entre a polaridade dos extratos e sua fitotoxicidade. Isso porque a maior atividade fitotóxica foi observada nos extratos brutos obtidos com os solventes acetato de etila e álcool metílico em relação a solventes de menor ou maior polaridade (SOUZA FILHO, 2002).

4.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos brutos

Ao todo, foi possível identificar e quantificar dez compostos fenólicos nos extratos brutos, sendo que outros nove compostos não puderam ser identificados pela indisponibilidade de padrões. Dentre os compostos fenólicos identificados, seis já haviam sido detectados em trabalho anterior com extratos da parte aérea de capim-annoni-2: catequina, epicatequina, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido

cumárico (FAVARETTO et al., 2015a).

No extrato bruto hexânico não foram identificados nenhum dos compostos fenólicos utilizados como padrão. Esta característica era esperada, uma vez que esta fração corresponde àquela que contém outros compostos, não fenólicos, e que apresentam menor interação com a fase móvel e estacionária utilizadas no método cromatográfico, justamente por serem apolares ou de baixa polaridade (Figura 4.4).

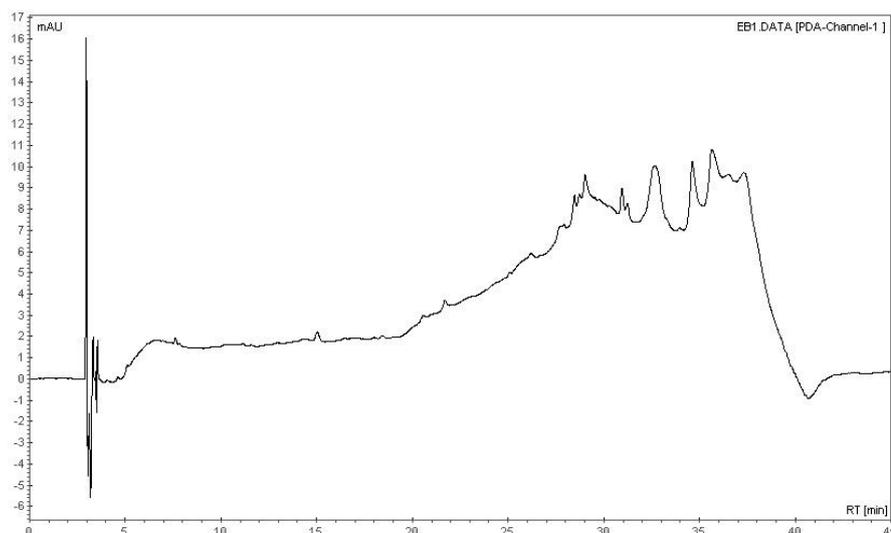


Figura 4.4 – Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto hexânico da parte aérea de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

No perfil cromatográfico do extrato bruto hexânico, foi possível perceber dificuldade para separação dos analitos com a metodologia empregada. O objetivo desta análise, no entanto, foi justamente verificar a presença de compostos fenólicos. Este foi, dentre os quatro extratos brutos de capim-annoni-2 avaliados, aquele que apresentou a segunda menor redução no desenvolvimento de plântulas de trigo e alfafa nos bioensaios de fitotoxicidade, situando-se abaixo apenas do extrato aquoso. Por isso, apesar de apresentar fitotoxicidade menor que a observada nos extratos brutos acetato de etila e metanólico, esta fração ainda pode ser explorada em futuros trabalhos para a identificação e quantificação de aleloquímicos, sobretudo aqueles de menor polaridade.

No extrato bruto acetato de etila foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico,

catequina e epicatequina. Entre eles, o ácido gálico foi o único composto identificado exclusivamente no extrato acetato de etila. Também foram registrados outros quatro compostos nos cromatogramas, que não puderam ser identificados pela indisponibilidade de padrões (Figura 4.5).

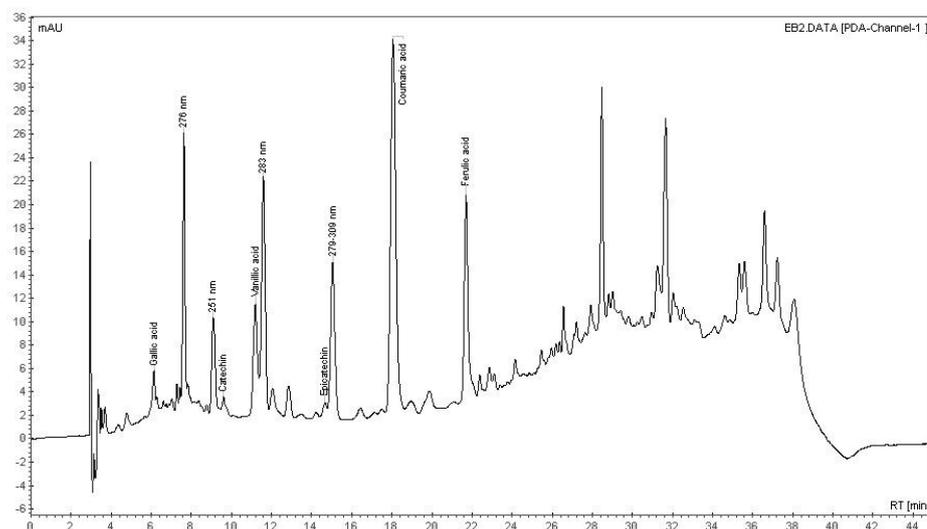


Figura 4.5 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto acetato de etila da parte aérea de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O ácido cumárico é um aleloquímico que atua na fotossíntese, podendo reduzir a quantidade total de clorofila A e B em determinadas plantas alvo, como a soja, quando associado ao ácido ferúlico (EINHELLIG, 2004). Em bioensaio para avaliação do efeito inibitório de ácido cumárico na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Souza Filho, Pereira e Bayma (2005) reportaram reduções de 25 e 55 % no comprimento de radículas *Mimosa pudica* e *Senna occidentalis*, respectivamente.

O ácido ferúlico é um dos aleloquímicos mais estudados, sendo responsabilizado por alterações no balanço hídrico, na ação de enzimas, na interação entre hormônios e na fotossíntese das plantas alvo (EINHELLIG, 2004). Temperaturas elevadas e baixos potenciais hídricos tendem a aumentar a fitotoxicidade deste aleloquímico. A concentração de $150 \mu\text{M}$ de ácido ferúlico associado ao potencial osmótico de $-0,15 \text{ MPa}$ diminuiu em 40 % a massa seca de plântulas de sorgo (EINHELLIG; ECKRICH, 1984).

O ácido gálico é considerado um aleloquímico capaz de influenciar o

balanço hídrico e a fotossíntese de plantas alvo quando associado a outros compostos fenólicos (EINHELLIG, 2004). Este composto fenólico em concentrações entre 10^{-2} e 10^{-5} M, tanto isoladamente quanto em mistura com outros cinco compostos fenólicos (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido *p*-vanílico) ocasionou diminuição na percentagem de germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus retroflexus*, *Solanum nigrum*, *Cirsium* sp. e *Rumex crispus* (REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999).

O ácido vanílico é um aleloquímico que apresenta ação sobre o fotossistema II das plantas receptoras, entre outros mecanismos (EINHELLIG, 2004). Assim como o ácido gálico, concentrações entre 10^{-2} e 10^{-5} M de ácido vanílico tanto isoladamente quanto associado a outros cinco compostos fenólicos também ocasionaram diminuição na percentagem de germinação e no desenvolvimento de plântulas de espécies invasoras (REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999). Destaca-se, nos bioensaios conduzidos por Reigosa, Souto e González (1999), os efeitos fitotóxicos do ácido vanílico na concentração de 10^{-2} M sobre *Solanum nigrum* e *Amaranthus retroflexus*, que reduziram em 98,66 e 95,88 % a germinação e o desenvolvimento da primeira e 98,21 e 97,53 % da segunda espécie receptora, respectivamente.

Os isômeros catequina e epicatequina possuem a mesma forma molecular, correspondendo a flavonóides capazes de inibir o transporte de elétrons, a hidrólise de ATP e a fotofosforilação (EINHELLIG, 2004). A (\pm) catequina é considerada um potente aleloquímico (LÔBO et al., 2008), sendo responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio em *Arabidopsis thaliana* e *Festuca idahoensis* (BAIS; KAUSHIK, 2010). Os bioensaios conduzidos por Bais e Kaushik (2010) permitiram observar que o isômero (-) catequina foi o que reduziu mais severamente o desenvolvimento radicular de plântulas alvo na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do que os demais enantiômeros. Além disso, foi observado que o ataque de larvas de artrópodes fitófagos e fungos ocasiona aumento na produção de catequina em *Centaurea maculosa*, planta invasora nos EUA (THELEN et al., 2005).

Os extratos brutos acetato de etila e metanólico, apresentaram as maiores reduções no desenvolvimento das plântulas nos bioensaios de fitotoxicidade. Por esta razão, acredita-se que esses extratos contenham aleloquímicos que

permitem justificar, pelo menos em parte, a toxicidade observada.

No extrato bruto metanólico foram identificados os compostos fenólicos ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina e rutina, sendo este último identificado exclusivamente nesse extrato. Tanto na amostra do extrato bruto acetato de etila quanto na amostra do extrato bruto metanólico foram detectados outros cinco compostos que não puderam ser identificados pela ausência de padrões. Um destes compostos não identificados também estava presente no extrato bruto de acetato de etila (Figura 4.6). Dentre os compostos fenólicos identificados no extrato bruto metanólico, os ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina e epicatequina já haviam sido identificados no extrato bruto acetato de etila.

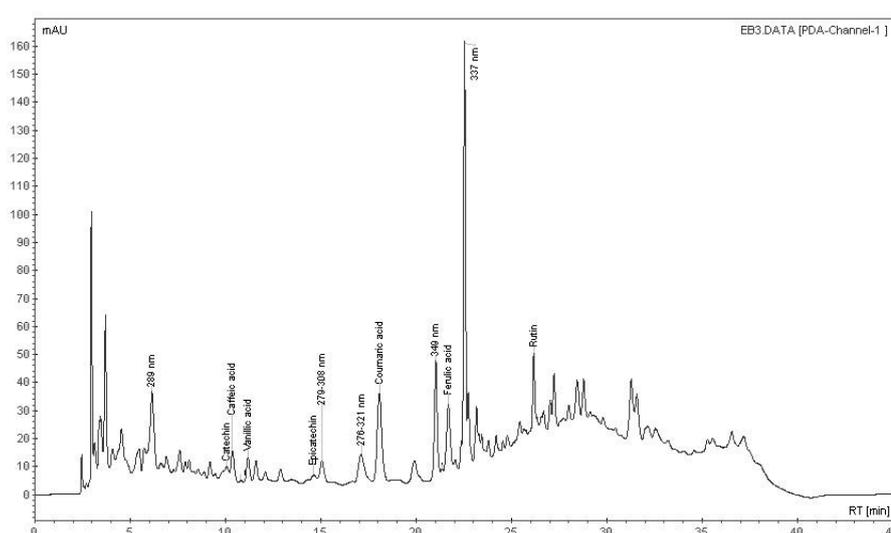


Figura 4.6 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto metanólico da parte aérea de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O ácido caféico é considerado um aleloquímico que pode alterar o balanço hídrico, a interação entre os hormônios, a ação de enzimas e a fotossíntese das plantas alvo (EINHELLIG, 2004). Este aleloquímico diminui o crescimento de *Euphorbia esula* a partir da concentração de 0,1 mM de ácido caféico em água (BARKOSKY; EINHELLIG; BUTLER, 2000).

Rutina é um aleloquímico cuja fitotoxicidade já foi demonstrada em trabalhos anteriores, muito embora o efeito seja mais pronunciado quando da

presença de outros flavonóides (EINHELLIG, 2004; SANTOS et al., 2011). No solo, a rutina parece ser facilmente degradada por enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. niger* (RICE, 1984). A rutina já foi identificada em extratos brutos de trigo-mourisco (*Fagopyrum tataricum*) (IQBAL et al., 2002) e serralha (*Sonchus oleraceus*) (GOMAA et al., 2014). O extrato bruto metanólico foi aquele que, juntamente com o extrato acetato de etila, apresentou as maiores reduções no desenvolvimento das plântulas nos bioensaios de fitotoxicidade. Por esta razão, acredita-se que os compostos presentes na amostra do extrato bruto metanólico também contenham aleloquímicos que permitem justificar, pelo menos em parte, a toxicidade observada.

Por fim, o último produto do processo de extração exaustiva, o extrato bruto aquoso permitiu identificar os compostos fenólicos ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina e resveratrol. Entre eles, o resveratrol foi o único composto identificado exclusivamente no extrato aquoso. Assim como nas amostras dos extratos brutos acetato de etila e metanólico, na amostra do extrato bruto aquoso também foram registrados compostos que não puderam ser identificados pela indisponibilidade de padrões (Figura 4.7).

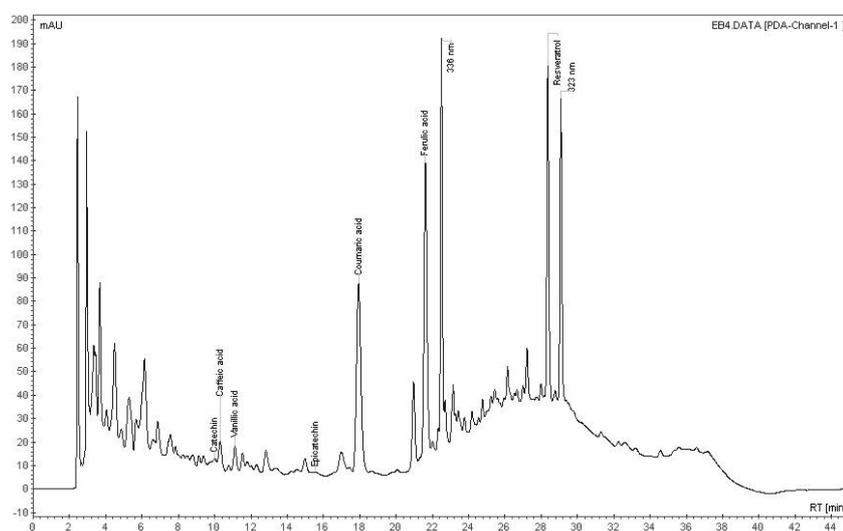


Figura 4.7 –Perfil cromatográfico da amostra de extrato bruto aquoso da parte aérea de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). Os fenólicos identificados apresentam o nome sobre os picos enquanto que os não identificados apresentam apenas o respectivo comprimento de onda. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Os compostos fenólicos ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina e

epicatequina, identificados no extrato bruto aquoso, já haviam sido identificados tanto no extrato bruto acetato de etila quanto no metanólico. Mesmo com a extração exaustiva, estes compostos fenólicos foram extraídos por três solventes em sequência, reforçando a teorização de que estes compostos do tecido da parte aérea de capim-annoni-2 apresentam afinidade por solventes de diferentes polaridades.

O resveratrol é um estilbeno, de ampla ocorrência nas espécies vegetais e ao qual a medicina credita propriedades medicinais importantes (SEIGLER, 2006). Além das propriedades antioxidantes, o resveratrol também é tratado como aleloquímico, tendo sido responsabilizado pela invasibilidade de espécies do gênero *Reynoutria*, (VRCHOTOVÁ; ŠERÁ; TRÍSKA, 2007) e de *Buddleja davidii* em algumas regiões do continente Europeu (FAN, 2009). Para esta última espécie, o resveratrol foi considerado por Fan (2009), incluindo outras espécies alvo, mais tóxico que a catequina.

O extrato bruto aquoso foi aquele que apresentou fitotoxicidade moderada no desenvolvimento de plântulas de alfafa e efeito estimulatório para o desenvolvimento de plântulas de trigo. Este resultado contraditório permite hipotetizar que a fitotoxicidade do extrato aquoso, principalmente, varia conforme características intrínsecas da espécie receptora. Por esta razão, acredita-se que o extrato bruto aquoso também contenha aleloquímicos que permitem justificar, pelo menos em parte, a toxicidade observada e, além disso, o efeito estimulatório para o desenvolvimento de espécies gramíneas. Esta hipótese pode ser amparada pelas elevadas concentrações de ácido cumárico e ferúlico e resveratrol, de forma que os dois primeiros compostos aparecem em inúmeros registros na literatura científica atuando como inibidores da germinação e do desenvolvimento de plântulas, e o terceiro possui elevada atividade antioxidante, apesar de poucos trabalhos o apontarem como aleloquímico.

A combinação da identificação de ácido ferúlico, caféico, vanílico e cumárico em extratos de folhas e raízes de *E. plana* com os resultados de trabalhos anteriores visando determinar o mecanismo de ação destes, permite teorizar sobre os seus efeitos alelopáticos nas plantas alvo. As informações consultadas indicam que a presença do capim-annoni-2 pode ocasionar influência sobre hormônios vegetais, a absorção de minerais, o balanço hídrico, o funcionamento dos estômatos, a

fotossíntese, a respiração, a síntese de certos compostos orgânicos e também o fluxo de carbono das plantas alvo presentes na mesma comunidade vegetal.

Os compostos fenólicos que apresentaram as maiores concentrações totais na fitomassa da parte aérea de capim-annoni-2 foram ácidos cumárico e ferúlico, seguidos de catequina e epicatequina, que apresentaram menos da metade da concentração dos primeiros. O ácido vanílico, em concentração inferior à da catequina e epicatequina, apresenta aproximadamente o dobro da concentração de ácido caféico e rutina (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Concentrações de compostos fenólicos identificados nas amostras de extratos brutos hexânico, acetato de etila, metanólico, aquoso e total determinadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria seca da parte aérea do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Composto fenólico | Concentrações nos extratos [$\mu\text{g.g}^{-1}$ de fitomassa] | | | | |
|----------------------|---|------------------|------------|----------|-------|
| | Hexânico | Acetato de etila | Metanólico | Aquoso | Total |
| Ácido caféico | 0,00 | 0,00 | 5,98 | 3,31 | 9,29 |
| Ácido cumárico | 0,00 | 15,77 | 16,40 | 22,68 | 54,86 |
| Ácido ferúlico | 0,00 | 7,68 | 10,43 | 28,85 | 46,96 |
| Ácido gálico | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 |
| Ácido vanílico | 0,00 | 7,21 | 5,93 | 3,94 | 17,07 |
| Catequina | 0,00 | 2,18 | 19,13 | 2,64 | 23,95 |
| Epicatequina | 0,00 | 3,66 | 6,69 | 2,22 | 12,57 |
| Resveratrol | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 21,81 | 21,81 |
| Rutina | 0,00 | 0,00 | 8,46 | 0,00 | 8,46 |
| Desc. 1 (276 nm) | Ausente | Presente | Ausente | Ausente | N/A |
| Desc. 2 (251 nm) | Ausente | Presente | Ausente | Ausente | N/A |
| Desc. 3 (283 nm) | Ausente | Presente | Ausente | Ausente | N/A |
| Desc. 4 (279-309 nm) | Ausente | Presente | Presente | Ausente | N/A |
| Desc. 5 (289 nm) | Ausente | Ausente | Presente | Ausente | N/A |
| Desc. 6 (276-321 nm) | Ausente | Ausente | Presente | Ausente | N/A |
| Desc. 7 (349 nm) | Ausente | Ausente | Presente | Ausente | N/A |
| Desc. 8 (336-337 nm) | Ausente | Ausente | Presente | Presente | N/A |
| Desc. 9 (323 nm) | Ausente | Ausente | Ausente | Presente | N/A |

N/A – Não se aplica

Com exceção do extrato hexânico, ácidos cumárico, ferúlico, vanílico, catequina e epicatequina foram os compostos mais frequentes, tendo sido identificados em todos os demais extratos da parte aérea de capim-annoni-2. A ausência de especificidade observada entre estes compostos fenólicos e os solventes pode comprometer os resultados de trabalhos que visam a quantificação de compostos utilizando um único solvente no processo de extração. Mesmo assim, as quantidades totais de aleloquímicos identificados na parte aérea de capim-annoni-2 no presente trabalho foram extremamente baixas quando comparadas às quantidades

correspondentes no trabalho de Favaretto et al. (2015a). A menor diferença de concentração entre os trabalhos de quantificação de compostos fenólicos na massa seca da parte aérea foi observada para ácido ferúlico, que foi quantificado em 6.000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no trabalho anterior e 46,96 $\mu\text{g.g}^{-1}$ neste, valor 127 vezes menor que o primeiro. A maior diferença entre as concentrações foi registrada para catequina, com concentração de 956.000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no trabalho anterior e 23,95 $\mu\text{g.g}^{-1}$ neste foi 39.916 vezes menor. A concentração de catequina encontrada por Favaretto et al. (2015a) equivale a quase 1 % da massa seca das folhas.

Ressalta-se que o método de extração empregado e o material vegetal utilizado no presente estudo foram diferentes do trabalho de Favaretto et al. (2015a). Enquanto neste estudo adotou-se a metodologia de extração exaustiva com diferentes solventes na parte aérea da planta (colmo e folhas), no último a extração foi efetuada com turbo hidroddestilação das folhas seguida de liofilização. Além do método de extração, o congelamento da fitomassa antes do seu processamento e o fato da coleta de plantas ter sido efetuada em locais e estágios de desenvolvimento distintos, também podem ter influência na identificação e quantificação dos compostos.

4.3.3 Relações entre fitotoxicidade e concentrações de compostos fenólicos

A associação entre as variáveis do bioensaio de fitotoxicidade e as variáveis da análise de compostos fenólicos foi verificada pela análise de correlação linear de Pearson. Foi identificada correlação entre a concentração de ácido vanílico e o comprimento da radícula de alfafa ($r = -0,89$) e o comprimento total de alfafa ($r = -0,96$). O sinal indica ocorrência de relações inversamente proporcionais, e o número correlação de forte magnitude ($> 0,70$) entre a concentração de ácido vanílico e os comprimentos de radícula e total de alfafa. Com isto, espera-se menores comprimentos de radícula e total de alfafa quanto maior for a concentração de ácido vanílico presentes nos extratos brutos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as concentrações dos compostos fenólicos identificados nos extratos brutos e o comprimento de radícula, hipocótilo e total de alfafa (*Medicago sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Composto fenólico | Alfafa | | | Trigo | | |
|-------------------|----------|------------|---------|----------|------------|-------|
| | Radícula | Hipocótilo | Total | Radícula | Hipocótilo | Total |
| Ác. caféico | -0,56 | -0,26 | -0,50 | -0,06 | 0,23 | 0,01 |
| Ác. cumárico | -0,83 | -0,43 | -0,76 | 0,04 | -0,28 | -0,04 |
| Ác. ferúlico | -0,55 | 0,05 | -0,38 | 0,45 | 0,00 | 0,36 |
| Ác. gálico | -0,43 | -0,71 | -0,57 | -0,49 | -0,80 | -0,60 |
| Ác. vanílico | -0,89 * | -0,86 | -0,96 * | -0,46 | -0,58 | -0,52 |
| Catequina | -0,55 | -0,55 | -0,59 | -0,43 | 0,08 | -0,33 |
| Epicatequina | -0,80 | -0,80 | -0,87 | -0,51 | -0,26 | -0,48 |
| Resveratrol | -0,23 | 0,42 | -0,02 | 0,70 | 0,17 | 0,61 |
| Rutina | -0,44 | -0,50 | -0,50 | -0,45 | 0,14 | -0,33 |

* Significativo com $p < 0,05$

Em trabalhos anteriores, já foi atribuído ao ácido vanílico a redução na massa seca, expansão foliar, produção de fotoassimilados, condutância estomática e conteúdo de clorofila nas folhas de soja (PATTERSON, 1981). Em outro trabalho, com tomate, a fitotoxicidade do ácido vanílico mostrou depender da concentração, pois enquanto a concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ocasionou efeito estimulatório, a concentração de $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ocasionou efeito inibitório sobre a germinação das sementes de tomate (GHAREIB; ABDELHAMED; IBRAHIM, 2010). A concentração presente na solução de extrato bruto da fração de acetato de etila do presente trabalho foi de $0,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor intermediário entre as duas concentrações avaliadas em tomate (dados referentes a concentração dos compostos fenólicos nos extratos brutos a 1 % utilizados nos bioensaios de fitotoxicidade não mostrados).

Em bioensaio testando a fitotoxicidade de epicatequina em plântulas de *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, concentrações acima de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ resultaram em inibições acima de 10 % no comprimento da radícula das duas espécies daninhas, sendo o efeito inibitório mais pronunciado sobre a última (LÔBO et al., 2008). No presente trabalho, a maior concentração de epicatequina entre as soluções de extrato bruto de parte aérea de capim-annoni-2 ocorreu na solução de extrato bruto metanólico a 1 % e foi de $0,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O ácido cumárico, dentre outros ácidos fenólicos, diminuiu o alongamento radicular de plântulas de vários híbridos de milho, assim como o ácido ferúlico. No entanto, solução composta por mistura de ácido cumárico e ferúlico não

resultou em diminuição no comprimento radicular das plântulas de milho (JANOVICEK et al., 1997). Em outro estudo avaliando o efeito de sete compostos fenólicos na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Deschampsia flexuosa*, *Scrophularia nodosa*, *Senecio sylvaticus* e *Chamaenerion angustifolium*, o ácido cumárico foi o responsável pelas maiores reduções do alongamento radicular das plântulas (KUITERS, 1989). O ácido cumárico também ocasionou redução na concentração de clorofila em folhas de soja (EINHELLIG; RASMUSSEN, 1979) .

Avaliando a toxicidade de ácido gálico Liu, Li e Huang (2013) identificaram efeito estimulatório até $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e inibitório a partir de $15,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre o alongamento celular, enzimas, carboidratos solúveis e clorofila a de algas. Nos extratos brutos de capim-annoni, o ácido gálico foi identificado apenas na fração acetato de etila, e no bioensaio de fitotoxicidade sobre o desenvolvimento de plântulas estava presente na solução com extrato bruto a 1% em concentração de $0,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.4 CONCLUSÕES

O extrato acetato de etila foi aquele que apresentou a maior fitotoxicidade geral no desenvolvimento de plântulas de trigo e alfafa, sendo seguido em ordem decrescente pelo extrato metanólico, aquoso e hexânico.

Os extratos acetato de etila e metanólico resultaram em elevada fitotoxicidade tanto para plântulas de alfafa quanto para plântulas de trigo. O extrato hexânico resultou em média toxicidade para trigo e baixa toxicidade para alfafa, o extrato aquoso resultou em média toxicidade para alfafa e baixa toxicidade para trigo.

O extrato acetato de etila apresentou as maiores concentrações de ácido vanílico e ácido gálico, enquanto o extrato metanólico as maiores concentrações de ácido caféico, catequina, epicatequina e rutina e o extrato aquoso as maiores concentrações de ácido cumárico, ácido ferúlico e resveratrol.

Foi registrada correlação de elevada intensidade e inversamente proporcional entre a concentração de ácido vanílico nos extratos e o comprimento da radícula e total das plântulas de alfafa.

5 FITOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DA FITOMASSA DEGRADADA DE CAPIM-ANNONI-2 E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

RESUMO

O capim-annoni é uma das espécies invasoras exóticas com maior área ocupada na região Sul do Brasil. A sua habilidade ecológica em invadir agroecossistemas ocorre em função de suas características biológicas e químicas. Os objetivos do presente trabalho foram quantificar os fenóis totais do extrato aquoso da fitomassa seca degradada do capim-annoni-2 e avaliar seu efeito sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de três espécies cultivadas. A simulação da degradação da fitomassa seca da parte aérea de capim-annoni-2 foi realizada incubando o material, umedecido com água destilada, por período de 10 dias em ambiente sem luz e com temperatura controlada. O processo de extração foi realizado utilizando água como solvente. Os bioensaios de avaliação da fitotoxicidade do extrato sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de braquiária, alfafa e trigo foram conduzidos em câmara de crescimento em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Foram conduzidos seis experimentos, três avaliando a germinação e três avaliando o desenvolvimento de alfafa, braquiária e trigo. Os tratamentos avaliados foram o extrato aquoso de capim-annoni-2 e água destilada. A determinação dos fenóis totais no extrato foi realizada por meio de espectrofotometria. A quantidade de fenóis totais presentes no extrato aquoso da fitomassa degradada foi de aproximadamente $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, o que equivale a 1,35% da massa seca da parte aérea. A alfafa foi a espécie que demonstrou maior sensibilidade ao extrato aquoso da fitomassa degradada, sendo prejudicada tanto na germinação quanto no desenvolvimento de plântulas. Já braquiária e trigo foram prejudicadas apenas no desenvolvimento de plântulas. Braquiária foi a única espécie beneficiada pelo extrato aquoso da fitomassa degradada, apresentando número menor de plântulas anormais no processo de germinação. Mais estudos são necessários a fim de caracterizar os aleloquímicos presentes no extrato aquoso da fitomassa degradada, sua taxa de liberação e também seu comportamento em solos de áreas infestadas.

Palavras-chave: *Eragrostis plana* Nees. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu. *Medicago sativa* L. cv. Monarca. *Triticum aestivum* L. cv. IPR Catuara. Ecologia fitoquímica. Alelopatia.

ABSTRACT

The South African lovegrass is one of the species of exotic grasses with the largest invaded area in southern Brazil. Its ecological ability to invade agricultural ecosystems is due to its biological and chemical characteristics. The objectives of this study were to quantify total phenols in the aqueous extract of degraded residues of tough lovegrass and evaluate its effect on seed germination and seedling development of three cultivated species. The simulation of the South African lovegrass dry shots degradation was performed by incubating the material, moistened with distilled water, for a period of 10 days in a dark and temperature-controlled environment. The extraction process was performed using water as solvent. The determination of the total phenols in the extract was performed with spectrophotometry. The bioassays

evaluating the phytotoxicity of the extract on the germination and development of palisade grass, alfalfa and wheat seedlings were conducted in BOD in a completely randomized design with six replicates. Six experiments were conducted, three evaluating the germination and three evaluating the development of alfalfa, brachiaria and wheat. The treatments were the aqueous extract of South African lovegrass and distilled water. The amount of total phenolic compounds present in the aqueous extract of degraded residues was $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, which corresponds to 1.35 % of the shoots dry weight. Alfalfa was the species that showed higher sensitivity to the aqueous extract of degraded residues, being impaired during germination and seedling development. In the other hand, signal grass and wheat were affected only in seedling development. Brachiaria was the only species to benefit from the aqueous extract of degraded residues, showing a smaller number of abnormal seedlings in the germination process. It is believed that more studies are needed to characterize the chemical components present in the aqueous extract of degraded residues of tough lovegrass, as well their rate of release and the behaviour of the allelochemicals in soil of contaminated areas.

Keywords: *Eragrostis plana* Nees. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu. *Medicago sativa* L. cv. Monarca. *Triticum aestivum* L. cv. IPR Catuara. Phytochemical ecology. Allelopathy.

5.1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma das cerca de 400 espécies descritas no seu gênero ao redor do mundo (CLAYTON et al., 2006). Trata-se de uma planta da família Poaceae e subfamília Chloridoideae, com ciclo de vida perene, que se reproduz por sementes (USDA, 2015). Originária do continente africano, foi introduzida acidentalmente no Brasil, onde chegou a ser disseminada como forrageira na região Sul do país por alguns anos da década de 1970. Em 1979, foi categorizada como planta invasora de difícil erradicação e por isso sua comercialização e cultivo foram proibidos no Brasil (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Mesmo depois de ter sido classificada como planta invasora, o capim-annoni tem aumentado a área infestada, com preferência para locais que não sofrem revolvimento do solo frequente, como áreas de campo, pastagem e beiras de estrada (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Depois de invadir agroecossistemas, o capim-annoni costuma se transformar na espécie dominante da comunidade vegetal. Parte desta dominância é atribuída ao fato da espécie possuir mecanismos de defesa e preservação bem desenvolvidos, tais como elevada competitividade por água, luz e nutrientes, grande produção de sementes com elevada viabilidade, grande poder de disseminação e baixo consumo pelos animais (REIS; COELHO, 2000). A espécie também apresenta características anatômicas e histoquímicas que explicam sua persistência em situações de estresse (FAVARETTO et al., 2015b).

Além das características que a tornam excelente competidora, especula-se que o capim-annoni-2 utilize seu metabolismo especializado para a produção de aleloquímicos. A partir do momento em que essas substâncias são liberadas no meio pelas plantas produtoras, podem entrar em contato com plantas alvo, limitando sua germinação e o seu desenvolvimento. Essa característica, que costuma ser comum em plantas invasoras de ecossistemas, tem sido observada em outras espécies, podendo ocorrer simultaneamente com a competição por recursos (HIERRO; CALLAWAY, 2003; WARDLE et al., 1998). Parte dessa característica já foi atribuída ao capim-annoni em trabalhos testando o extrato da planta em espécies de gramíneas perenes estivais e trevo-branco (*Trifolium repens*) (FAVARETTO et al., 2011; FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008). Ainda assim, são raros os trabalhos explorando a ecologia fitoquímica dessa importante espécie, tanto em bioensaios de fitotoxicidade quanto na identificação e quantificação de aleloquímicos.

Os aleloquímicos podem ser classificados de acordo com sua característica química, vias de biossíntese ou mecanismo de ação na planta alvo. Uma das grandes classes de compostos alelopáticos é a dos fenóis (LI et al., 2010) e muitas das atividades alelopáticas de gramíneas são atribuídas a essa classe de compostos (MACÍAS et al., 2007). Os compostos fenólicos são reconhecidos por apresentarem anel benzeno ligado a hidroxila e estão envolvidos em muitos mecanismos de defesa dos vegetais. Eles são sintetizados nas plantas predominantemente pela rota do ácido chiquímico à partir da fenilalanina, por meio da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (MANN, 1992). Alguns trabalhos já identificaram correlação inversamente proporcional entre a concentração de fenóis totais presentes em extratos aquosos de plantas e o comprimento de radícula de espécies receptoras (AN; PRATLEY; HAIG, 2001).

Segundo revisão realizada por Li et al. (2010), são conhecidos pelo menos seis mecanismos de ação distintos dos compostos fenólicos sobre plantas alvo. Eles podem modificar a permeabilidade da membrana e inibir a absorção de nutrientes, como foi reportado para os ácidos benzóico e cinâmico. A divisão e o alongamento celular podem ser inibidos pela cumarina. Podem influenciar a fotossíntese e a respiração, como por exemplo, os ácidos caféico, ferúlico, cumárico, cinâmico, vanílico e benzóico. A função e a atividade de enzimas pode ser modificada pelos ácidos ferúlico, caféico e tânico. A síntese de hormônios endógenos pode ser

influenciada pelo ácido benzóico e polifenóis, que afetam a decomposição de ácido indolacético e giberelina. Por fim, podem também alterar a síntese de proteínas, pois vários compostos fenólicos reduzem a integridade do DNA e do RNA.

Diferentemente de outras classes de compostos químicos com propriedades alelopáticas, grande parte dos fenóis é solúvel em água. Essa característica pode facilitar o seu transporte da planta produtora para a planta alvo, assim como o seu transporte dentro da planta depois de ser absorvido (CHOU; LEU, 1992). Além disso, a ocorrência de outras substâncias junto aos fenóis ou a combinação de diferentes fenóis pode ocasionar efeitos sinérgicos, aumentando a ação alelopática desses compostos mesmo quando presentes em baixas concentrações (BLUM, 1996; RASMUSSEN; EINHELLIG, 1979). Por isso, a determinação dos fenóis totais pode constituir em um dos passos para determinação do potencial alelopático de fenóis de plantas doadoras (INDERJIT, 1996).

Assim como as características químicas do aleloquímico e a sua concentração no ambiente, a sua dinâmica de liberação no ambiente é outro ponto importante no estudo das interações alelopáticas. Plantas produtoras de aleloquímicos podem liberar esses compostos de maneira ativa ou a partir da degradação de seus tecidos (BÖRNER, 1960). Com o passar do tempo, as substâncias que encontram-se no solo tendem a ser inativadas por fatores bióticos e abióticos, e se não houver liberação contínua, as concentrações baixam a níveis que podem ser tolerados pelas plantas alvo (AN; PRATLEY; HAIG, 2001).

Muitos estudos a fim de evidenciar o efeito alelopático de compostos produzidos por plantas criam condições artificiais para isolar a atividade de determinada substância e testar sua fitotoxicidade. Por serem desenvolvidos utilizando técnicas e metodologias muito distantes das condições ambientais observadas à campo, costumam ser criticados (INDERJIT; NILSEN, 2003). Um questionamento frequente diz respeito a experimentos testando a fitotoxicidade de extratos de plantas obtidos com a utilização de solventes que não ocorrem naturalmente no ambiente. Por outro lado, estudos conduzidos exclusivamente a campo são influenciados por inúmeros fatores, constituindo, muitas vezes, interações complexas quase impossíveis de serem identificadas. Portanto, parece existir a necessidade de combinação de metodologias que permitam aproximar a precisão dos

trabalhos conduzidos em laboratório das condições observadas a campo (WU et al., 2001).

O objetivo desse trabalho foi quantificar os fenóis totais presentes no extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni por período de 10 dias e também avaliar a influência do extrato aquoso na germinação e no desenvolvimento de plântulas de alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de Fisiologia Vegetal e de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Laranjeiras do Sul (PR). A metodologia utilizada foi adaptada a partir do trabalho de An, Pratley e Haig (2001).

5.2.1 Obtenção do extrato aquoso da fitomassa incubada

A fitomassa da parte aérea de 200 plantas de capim-annoni em final de ciclo reprodutivo foi coletada aleatoriamente em área infestada no município de Abelardo Luz (SC) (coordenadas: -26.527820, -52.255808), no mês de abril de 2015. As plantas foram cortadas manualmente com uso de tesoura a 1 cm da superfície do solo e a parte aérea amostrada foi mantida em congelador a -26 ± 2 °C até o momento de secagem. A secagem foi realizada em estufa com circulação forçada de ar, modelo 400 marca Ethiktechnology, a 40 °C por 72 horas no mês de maio de 2015. Logo após a secagem, a amostra foi moída em moinho tipo Wiley (tela de 2 mm) e acondicionada em frascos de vidro (500 mL) com tampa e lacrados com filme plástico, para evitar troca de umidade com o ambiente externo.

Para a preparação do extrato de fitomassa degradada, foram colocados 25 g de parte aérea seca e moída de annoni em frasco de vidro (500 mL) com tampa furada (3 furos de 2 mm) para permitir trocas gasosas. Depois de adicionado 75 mL de água destilada o material foi misturado. A amostra foi então incubada em sala escura a 20 °C por período de 10 dias. A umidade foi mantida com a reposição diária da massa de água perdida por evaporação com uso de balança modelo AUY220 marca Shimadzu®.

Posteriormente, após o período de incubação da amostra, foi obtido o extrato aquoso, por meio da adição de 500 mL de água destilada à mesma, seguindo-se a mistura por 10 minutos em agitador orbital incubadora (tipo *shaker*) modelo Star FT 38 marca Fortinox a 200 rpm e 25 °C e a colocação em repouso por mais 5 minutos em temperatura ambiente. As misturas foram decantadas, filtradas em gaze, centrifugadas por 40 minutos a 3900 rpm e o sobrenadante passado em filtro de papel (poros de 25 µm). O volume de extrato aquoso recuperado foi de aproximadamente 450 mL. O material decantado foi descartado.

Por fim, foram realizadas avaliações do pH e da condutividade elétrica do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni e da água destilada utilizada como controle (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Características físico-químicas do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni e da água destilada. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Material | pH | Condutividade elétrica [µS.m ⁻² .s] |
|----------------|------|---|
| Extrato aquoso | 7,13 | 735,8 |
| Água destilada | 6,12 | 3,63 |

5.2.2 Quantificação de fenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais, 50 mL do extrato foi misturado a 150 mL de acetona PA. A solução foi submetida à agitação utilizando agitador magnético modelo C-MAG HS7 marca Ika® em velocidade baixa (~15 rpm) em temperatura ambiente (~22 °C) por período de 12 horas. Proteínas e lipídios do sobrenadante foram precipitadas e filtradas com vácuo em duas camadas de papel filtro com porosidade de 25 µm. O precipitado foi descartado. A acetona foi removida do extrato com uso de evaporador rotativo modelo BT351 marca Biotech a 40 °C. O líquido resultante foi lavado com 3 porções de 100 mL de hexano e em seguida 3 vezes com 100 mL de éter. A fase contendo hexano foi descartada. A fase etérea foi seca com uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O éter foi removido com evaporador rotativo a 40 °C e o resíduo (3,49 g) foi diluído em 20 mL de água destilada. As amostras transferidas às cubetas para leitura no espectrofotômetro modelo 1600UV marca Nova. A constituição das cubetas foi realizada com 100 µL do extrato, 600 µL de NaCO₃ (7,5 % m/v), 700 µL de água

destilada e 200 µL de reagente Folin-Ciocalteu, com essa mistura sendo aquecida a 50 °C por 10 minutos e diluída com 1,0 mL de água destilada antes da leitura no espectrofotômetro. A curva analítica foi construída em função de concentrações 0, 10, 20, 30 e 40 µg/mL para o ácido gálico em 760 nm. As substâncias fenólicas presentes na amostra avaliada foram reportadas em equivalente de microgramas de ácido gálico por mililitro de extrato aquoso de fitomassa degradada de capim-annoni-2.

5.2.3 Bioensaio de germinação

Para testar o efeito do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2 na germinação de braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu), alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) foram dispostas 20 sementes de cada espécie em caixa tipo Gerbox, em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Foram conduzidos três bioensaios, um para cada espécie alvo, com o extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 incubada por 10 dias e a água destilada constituindo os tratamentos. As caixas foram forradas com papel de germinação e umedecidas com 3,7 mL de extrato aquoso ou água destilada, o equivalente a 2,5 vezes sua massa. As espécies foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD modelo BF2 CGFP 295 marca Biofoco, utilizando as temperaturas de 20/35 °C (noturna/diurna) para braquiária e 20 °C para trigo e alfafa, todas com ciclo de luminosidade de 12 horas. A contagem de germinação de braquiária iniciou 72 horas após a semeadura, enquanto para alfafa e trigo a contagem foi iniciada 48 horas após a semeadura. As contagens foram realizadas diariamente até a estabilização do período de germinação, quando ocorreu a avaliação final seguindo as normas brasileiras para a análise de sementes (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação foi calculado segundo a equação de Maguire (1962) (Equação 5.1):

$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + (G3/N3) + \dots + (Gn/Nn) \quad [5.1]$$

Em que: IVG representa o índice de velocidade de germinação, Gn é o número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem e Nn é o número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

Foram realizadas análises de regressão entre o percentual de germinação de cada uma das espécies e o tempo. Cada curva de germinação foi ajustada ao modelo de crescimento de Weibull (1951) (Equação 5.2):

$$Y = Y_M - (Y_M - Y_0) \exp \{-1 [(kX)^g]\} \quad [5.2]$$

Em que: Y representa a germinação, Y_M é o ponto de máxima germinação, Y₀ é o ponto de mínima germinação, k é o produto da divisão de um pelo valor de X no ponto médio de Y na inflexão da curva, X é o tempo em dias e g é o valor inicial a ser ajustado.

A avaliação de germinação final foi realizada para alfafa, braquiária e trigo aos 9, 12 e 7 DAS, respectivamente.

5.2.4 Bioensaio de desenvolvimento de plântulas

Para obtenção de plântulas de braquiária brizanta, alfafa e trigo foram colocadas para germinar 1.200 sementes de cada espécie na mesma BOD utilizada para o bioensaio para avaliação de germinação, com papel de germinação umedecido em 2,5 vezes sua massa com água destilada. Foi utilizada alternância de temperatura 20/35 °C (noturna/diurna) para braquiária e para as outras duas espécies a temperatura foi constante a 20 °C, todas com ciclo de luminosidade de 12 horas. Para uniformização das plântulas utilizadas, as mesmas foram medidas 72 e 48 horas após o início da incubação, respectivamente para braquiária brizanta e para as outras duas espécies.

Foram selecionadas as plântulas de alfafa com comprimento de radícula entre 10 e 12 mm, plântulas de trigo com radícula entre 1 e 3 mm e plântulas de braquiária com radícula entre 5 e 7 mm. Vinte plântulas de cada espécie pré-selecionadas foram dispostas em caixas tipo Gerbox com duas camadas de papel de germinação umedecidos com água destilada ou extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. As temperaturas de incubação e ciclo de luminosidade foram os mesmos utilizados para a etapa de germinação.

Após esse período foram medidos o comprimento da raiz mais longa e do coleóptilo (para braquiária brizanta e trigo) e do hipocótilo (para alfafa) de cada uma das plantas, utilizando paquímetro digital modelo PDV1500 marca Vonder®. A

média dos comprimentos de cada variável por Gerbox foi utilizada para a análise estatística. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições. Foram conduzidos três bioensaios, um para cada espécie alvo, com o extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 incubada por 10 dias e a água destilada constituindo os tratamentos.

5.2.5 Análise estatística

Efetou-se a análise de variância, e para determinar a ocorrência de diferença significativa entre as médias dos dois tratamentos (extrato aquoso de capim-annoni-2 e água destilada) empregou-se o teste F, ambos com o software estatístico Genes (CRUZ, 2013). Em algumas das variáveis, foi incorporado o erro padrão das médias dos tratamentos, a fim de revelar uma estimativa da variabilidade entre as repetições. Também foi utilizada análise de regressão para o ajuste das curvas de germinação no tempo.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Quantificação dos fenóis totais no extrato aquoso da fitomassa degradada

O extrato da fitomassa degradada de capim-annoni apresentou concentração de fenóis totais de $0,75 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração de fenóis do extrato aquoso da fitomassa degradada por 10 dias equivale a 1,35 % da massa seca da parte aérea, ou seja, após 10 dias de degradação, 1000 g de massa seca de fitomassa de capim-annoni pode liberar 0,7 g de fenóis. Esse valor equivale a $0,75 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa seca de parte aérea. A quantidade de fenóis totais em soluções costuma ser bom indicativo de fitotoxicidade. A presença de grandes quantidades de fenóis totais em extratos aquosos em geral corresponde a elevados níveis de inibição do crescimento de plantas (AN; PRATLEY; HAIG, 2001).

A quantidade de fenóis totais mostrou-se superior ao detectado em outras espécies vegetais. O valor de fenóis totais da fitomassa degradada de capim-annoni foi aproximadamente cinco vezes maior que o detectado na fitomassa de vulpia (*Vulpia myuros*), que foi de aproximadamente $150 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ com os mesmos 10 dias de decomposição de fitomassa (AN; PRATLEY; HAIG, 2001). A quantidade de fenóis totais também foi 3,3 vezes maior que a média dos valores registrados para o extrato aquoso de folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*), o tecido que registrou o maior valor

dentre os avaliados para a espécie (BEN-HAMMOUDA; MONCEF; MINOR, 1995). Esse valor também foi aproximadamente 4,3 vezes menor que o valor registrado para extrato metanólico e acetato de etila das folhas secas de *Allium ursinum*, que atingiu $3,24 \text{ mg.g}^{-1}$ (DJURDJEVIC et al., 2004).

5.3.2 Influência do extrato aquoso da fitomassa degradada na germinação

As sementes de alfafa, braquiária brizanta e trigo responderam de maneira diferenciada ao tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni e o controle com água destilada.

Para a variável germinação de alfafa, o tratamento com extrato diferiu da testemunha com água destilada pelo teste de hipótese ($p < 0,01$) realizado a partir dos resultados da análise de variância. A germinação também diferiu entre os dias após a semeadura ($p < 0,01$). A alfafa foi a espécie em que o tratamento com o extrato aquoso da fitomassa degradada ocasionou a germinação mais lenta e com total acumulado menor quando comparado ao tratamento com água destilada (Figura 5.1).

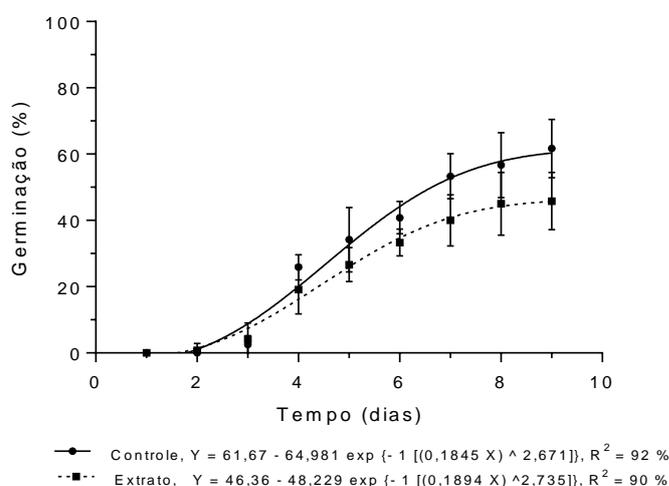


Figura 5.1 – Percentagem de germinação acumulada de alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem as médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

Para braquiária, a variável germinação com extrato também diferiu da testemunha com água destilada pelo teste de hipótese ($p < 0,01$) realizado a partir dos resultados da análise de variância. A germinação diferiu entre os dias após a

semeadura ($p < 0,01$). Ao contrário do observado para a germinação de alfafa, o extrato aquoso da fitomassa degradada permitiu maior e mais rápida germinação da braquiária (Figura 5.2).

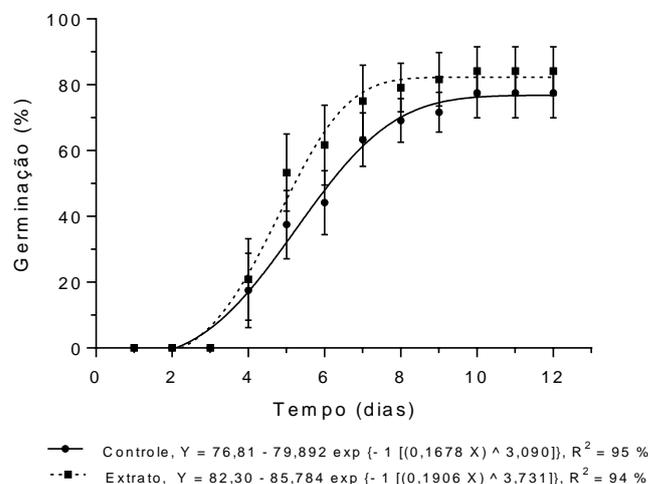


Figura 5.2 – Percentagem de germinação acumulada de braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem às médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

A variável germinação de trigo não foi influenciada pelo extrato, que não diferiu da testemunha com água destilada pelo teste de hipótese realizado a partir dos resultados da análise de variância. A porcentagem de germinação diferiu entre os dias após a semeadura ($p < 0,01$). Embora o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada tenha permitido que a espécie alcançasse maior valor de germinação no 7º DAS, as curvas de germinação foram praticamente equivalentes, corroborando o resultado do teste de hipótese que comparou o tratamento extrato aquoso com a testemunha (Figura 5.3).

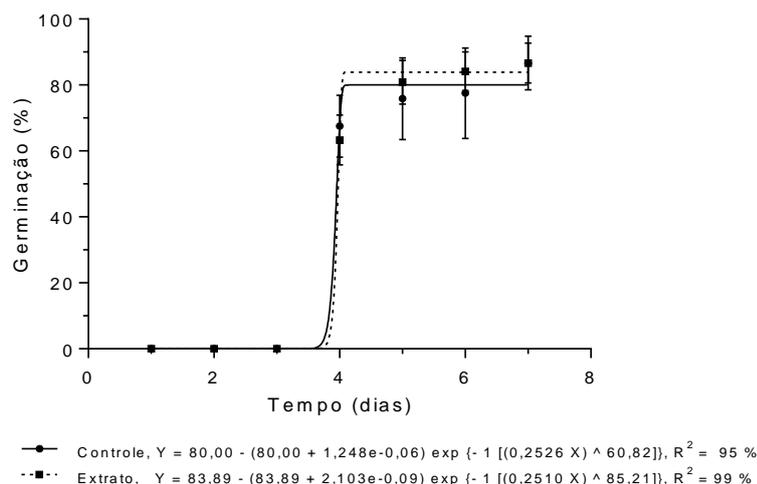


Figura 5.3 – Percentagem de germinação acumulada de trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) no tempo em dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos controle com água destilada e com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Os pontos correspondem as médias dos tratamentos com o erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. A curva representa o modelo não linear de Weibull, onde Y é a germinação (%) e X representa o tempo (dias). UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

As equações de regressão de Weibull foram utilizadas para determinar, por interpolação, os valores de t_{50} , que correspondem o tempo necessário para que cada tratamento expressasse 50% da germinação máxima (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Tempo necessário em dias para que alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) atingisse 50% da germinação máxima (t_{50}) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Espécie | Tratamento | |
|------------|------------|---------|
| | Testemunha | Extrato |
| Alfafa | 4,8 | 4,7 |
| Braquiária | 5,4 | 4,7 |
| Trigo | 4,0 | 4,0 |

A espécie que apresentou maior sensibilidade ao extrato aquoso de capim-annoni-2, considerando o t_{50} , em comparação a testemunha, foi braquiária. Nesta espécie, o tempo necessário para expressão de 50% da germinação máxima com o extrato foi aproximadamente 13% inferior do que o tempo necessário com a testemunha. Para as demais espécies os valores de t_{50} foram praticamente equivalentes, evidenciando baixa influência do extrato no processo germinativo.

Na avaliação final de germinação, no entanto, foram constatadas diferenças entre os tratamentos com extrato aquoso da fitomassa degradada e o

controle com água destilada para as variáveis plântulas normais, mortalidade e índice de velocidade de germinação de alfafa e plântulas anormais de braquiária (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Percentagem de plântulas normais, anormais, sementes quiescentes e mortalidade em alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni no 9°, 12° e 7° dia após a sementeira, respectivamente. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Espécie alvo | Tratamento | Plântulas normais [%] | Plântulas anormais [%] | Sementes quiescentes [%] | Mortalidade [%] | IVG |
|--------------|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Alfafa | Controle | 60,00 ± 3,65 * | 21,67 ± 2,11 ^{ns} | 12,50 ± 3,82 ^{ns} | 5,83 ± 0,83 * | 2,44 ± 0,09 * |
| | Extrato | 43,33 ± 3,33 * | 25,00 ± 2,24 ^{ns} | 11,67 ± 2,11 ^{ns} | 20,00 ± 4,83 * | 1,91 ± 0,15 * |
| Braquiária | Controle | 77,50 ± 3,10 ^{ns} | 5,83 ± 0,83 * | 10,83 ± 1,54 ^{ns} | 5,83 ± 2,39 ^{ns} | 2,76 ± 0,14 ^{ns} |
| | Extrato | 84,17 ± 3,00 ^{ns} | 0,83 ± 0,83 * | 9,17 ± 2,71 ^{ns} | 5,83 ± 1,54 ^{ns} | 3,21 ± 0,18 ^{ns} |
| Trigo | Controle | 86,67 ± 3,33 ^{ns} | 3,33 ± 2,11 ^{ns} | 3,33 ± 1,67 ^{ns} | 6,67 ± 2,11 ^{ns} | 4,03 ± 0,18 ^{ns} |
| | Extrato | 85,00 ± 2,58 ^{ns} | 5,83 ± 2,39 ^{ns} | 3,33 ± 1,05 ^{ns} | 5,83 ± 1,54 ^{ns} | 4,05 ± 0,12 ^{ns} |

* Valores (Média ± Erro Padrão) em cada coluna e espécie significativamente diferentes segundo teste F ($p < 0,05$); ^{ns} Não significativo

No tratamento com água destilada foi constatado maior percentual de plântulas normais do que naquele com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni. Além disso, o tratamento com água destilada ocasionou menor ocorrência de sementes mortas e plântulas anormais e maior índice de velocidade de germinação. Em trabalho utilizando extrato aquoso da parte aérea de capim-annoni em plântulas de trevo branco (*Trifolium repens*) verificou-se resultado similar para a variável mortalidade de plântulas (FAVARETTO et al., 2011).

Para a espécie braquiária, o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada ocasionou menor ocorrência de plântulas anormais do que o tratamento com água destilada. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para as demais variáveis analisadas, apesar do índice de velocidade de germinação ter apresentado tendência para maior valor no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2.

Em trigo, não foram registradas diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis nas condições avaliadas. Isso demonstra insensibilidade da espécie aos compostos presentes na fitomassa degradada de capim-annoni no processo germinativo. As diferenças percentuais entre os valores das variáveis analisadas no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada

de capim-annoni em relação ao tratamento controle com água destilada confirmam a maior sensibilidade do processo germinativo da alfafa em comparação a braquiária brizanta e ao trigo (Figura 5.4).

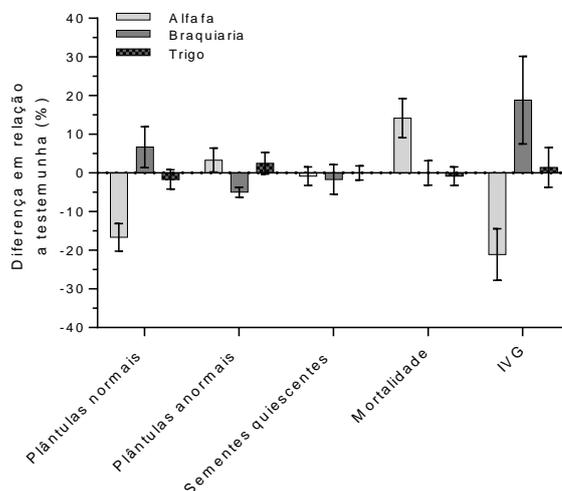


Figura 5.4 – Diferença de percentual de ocorrência de plântulas normais, anormais, sementes quiescentes, mortalidade e índice de velocidade de germinação entre o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada deannoni e a testemunha com água destilada para alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) no 9º, 12º e 7º dia após a semeadura, respectivamente. As barras correspondem a diferença média em percentagem entre os valores observados no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada deannoni e no tratamento controle com água destilada com as barras de erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

O número de plantas normais e o índice de velocidade de germinação de alfafa no tratamento com extrato foram 16,7 e 21,1 % inferiores aos valores registrados no tratamento controle, respectivamente. Outro registro negativo para a alfafa diz respeito à mortalidade, que foi 14,7 % maior no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada. A braquiária brizanta apresentou 5 % menos plântulas anormais no extrato do que a testemunha. Embora apenas com tendência (diferença não significativa), o IVG da braquiária foi 18,8 % superior no extrato em relação a testemunha. O trigo registrou valores semelhantes para todas as variáveis analisadas entre os tratamentos.

A diferença na sensibilidade do processo germinativo das espécies ao extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni é justificável, pois a sensibilidade das sementes aos compostos fenólicos é variável com a espécie e família, com a estrutura molecular do composto fenólico e com a sua concentração

(ALMAGHRABI, 2012). Algumas espécies de plantas demonstram tolerância aos mecanismos de ação dos compostos fenólicos. Além disso, as sementes possuem o tegumento, tecido protetor que controla a entrada e a saída de substâncias para o embrião mediante a permeabilidade seletiva. Assim, por se tratar de espécies diferentes e, portanto, com distinta constituição do tegumento, estes podem interagir de maneira diferenciada com os compostos fenólicos sendo disponibilizados ou não ao embrião.

Além disso, não se pode descartar, o fato que alguns compostos fenólicos podem agir em sinergia com determinados hormônios vegetais e promover aumento da germinação e crescimento de tecidos, enquanto outros podem agir negativamente e promover a descarboxilação de auxinas (TOMASZEWSKI; THIMANN, 1966) ou ligando-se ao ácido giberélico (JACOBSON; CORCORAN, 1977).

5.3.1 Influência do extrato aquoso da fitomassa degradada no desenvolvimento de plântulas

Foram registradas diferenças no desenvolvimento de plântulas de alfafa, braquiária e trigo entre o extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2 e a testemunha com água destilada, após o período de incubação, para algumas das variáveis avaliadas (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Comprimentos de radícula, de hipocótilo e total e massa de plântulas de alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) em função do tratamento controle com água destilada ou com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni 48 horas após a incubação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Espécie alvo | Tratamento | Comprimento de radícula [mm] | Comprimento de hipocótilo [mm] | Comprimento total [mm] | Massa plântulas [g] |
|--------------|------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Alfafa | Controle | 26,62 ± 0,93 * | 4,34 ± 0,28 ^{ns} | 30,96 ± 0,82 * | 2,25 ± 0,13 ^{ns} |
| | Extrato | 21,81 ± 0,50 * | 4,10 ± 0,14 ^{ns} | 25,90 ± 0,38 * | 2,47 ± 0,18 ^{ns} |
| Braquiária | Controle | 14,09 ± 0,47 * | 21,58 ± 0,98 ^{ns} | 35,67 ± 1,13 * | 1,77 ± 0,04 * |
| | Extrato | 11,76 ± 0,70 * | 19,91 ± 0,61 ^{ns} | 31,67 ± 0,73 * | 1,39 ± 0,09 * |
| Trigo | Controle | 33,30 ± 0,83 * | 11,07 ± 0,72 ^{ns} | 44,37 ± 1,50 * | 3,03 ± 0,06 * |
| | Extrato | 29,14 ± 0,27 * | 9,65 ± 0,54 ^{ns} | 38,79 ± 0,72 * | 2,77 ± 0,06 * |

* Valores (Média ± Erro Padrão) em cada coluna e espécie significativamente diferentes segundo teste F ($p < 0,05$); ^{ns} Não significativo

As plântulas de alfafa apresentaram menores comprimentos de radícula e total no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada do que no tratamento controle. As plântulas de braquiária brizanta e trigo também apresentaram sensibilidade ao extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni, registrando valores significativamente menores que o controle com água destilada para as variáveis comprimento de radícula, comprimento total de plântula e massa seca. Resultados similares com trigo foram reportados para extrato aquoso de sorgo, com os ácidos fenólicos sendo associados à redução no tamanho de radícula (BEN-HAMMOUDA; MONCEF; MINOR, 1995). Compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de *Allium ursium* também já foram responsabilizados pela redução no comprimento de radícula de trigo (DJURDJEVIC et al., 2004).

De maneira geral, as respostas observadas nas variáveis analisadas para desenvolvimento de plântulas apresentaram maiores diferenças percentuais entre o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada e o controle com água destilada (Figura 5.5), do que o observado no processo germinativo (Figura 5.4).

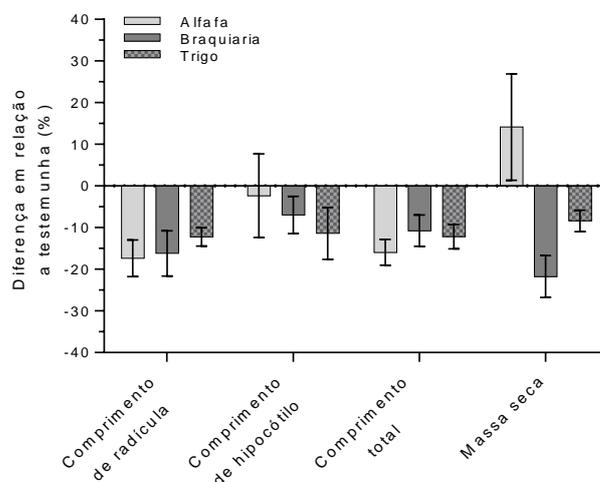


Figura 5.5 – Diferença percentual dos comprimentos de radícula, de hipocótilo e total e massa de plântulas entre o tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni e a testemunha com água destilada para alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) 48 horas após a incubação. As barras correspondem a diferença média em porcentagem entre os valores observados no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada de annoni e no tratamento controle com água destilada com as barras de erro padrão representando a variabilidade entre as repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

As plântulas de alfafa apresentaram comprimentos de radícula e total no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada 17,4 e 15,9 % menores aos

observados no controle, respectivamente. No tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada, plântulas de braquiária apresentaram comprimentos de radícula e total 16,2 e 10,7 % inferiores ao controle, respectivamente. A massa seca foi a que sofreu a maior redução entre as espécies avaliadas, com valor no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada 21,8 % inferior ao controle.

As plântulas de trigo, diferentemente das sementes, se mostraram sensíveis ao extrato aquoso da fitomassa degradada para algumas das variáveis analisadas. Elas apresentaram comprimentos de radícula e total 12,2 e 12,1 % menores no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada, em relação à testemunha. A massa seca das plântulas foi 8,4 % inferior no tratamento com extrato aquoso da fitomassa degradada, comparativamente ao controle.

5.3.2 Síntese da influência do extrato sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas

Resumindo, atribuiu-se a influência do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2 em cada um dos estágios de desenvolvimento e variáveis para alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Influência negativa (-), neutra (0) ou positiva (+) do extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 degradada por 10 dias sobre diferentes variáveis de sementes e plântulas de alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) comparativamente a testemunha com água destilada. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

| Estádio e variável | Espécie | | | |
|--------------------|---------------------|------------|-------|---|
| | Alfafa | Braquiária | Trigo | |
| Semente | Germinação | - | 0 | 0 |
| | Germ. anormal | 0 | + | 0 |
| | Mortalidade | - | 0 | 0 |
| | IVG | - | 0 | 0 |
| Plântula | Comp. de radícula | - | - | - |
| | Comp. de hipocótilo | 0 | 0 | 0 |
| | Comp. Total | - | - | - |
| | Massa seca | 0 | - | - |

Nota-se que o extrato apresentou efeito mais negativo sobre o desenvolvimento de plântulas do que sobre o processo germinativo. Isto talvez possa ser justificado em decorrência da presença do tegumento nas sementes. Este

revestimento além de atuar como barreira entre o embrião e o meio que o circunda, pode, em função da permeabilidade seletiva que exerce sobre a entrada de substância na semente, proteger o embrião do efeito fitotóxico dos compostos fenólicos por não permitir sua chegada ao tecido embrionário (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005; WIERZBICKA; OBIDZIŃSKA, 1998).

As variáveis que sofreram maiores reduções devido ao extrato aquoso de capim-annoni-2 foram comprimentos de radícula e total. Talvez devido ao fato da radícula ser o primeiro tecido a entrar em contato com os compostos fenólicos, e por ser a responsável pela absorção e transporte destes compostos até o xilema para o fluxo ascendente à parte aérea, verifica-se maior inibição deste tecido em relação ao hipocótilo (alfafa) e ao coleóptilo (trigo e braquiária). Também é possível que o ápice da raiz das plantas, a zona de crescimento, seja o local onde os elementos apresentem toxicidade. Como os comprimentos de hipocótilo e coleóptilo não foram influenciados pelo extrato, a redução da radícula deve ter contribuído também para a redução do comprimento total das plântulas submetidas ao extrato.

A alfafa foi a espécie que mostrou maior sensibilidade ao extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni, apresentando valores inferiores ao controle em cinco das variáveis analisadas e nos dois estádios: germinação e desenvolvimento de plântulas.

A braquiária apresentou resposta negativa ao extrato aquoso da fitomassa degradada apenas no estágio de plântula, quando três das variáveis analisadas registraram valores inferiores quando comparado ao controle. Esta também foi a única espécie entre as avaliadas que apresentou resposta positiva ao extrato aquoso da fitomassa degradada, que propiciou número menor de plântulas anormais do que o controle.

O trigo mostrou-se insensível ao extrato aquoso da fitomassa degradada no estágio de semente, com nenhuma das variáveis apresentando valores diferentes entre os tratamentos. No entanto, as plântulas de trigo foram influenciadas negativamente no tratamento com extrato, apresentando valores inferiores ao controle em três das quatro variáveis analisadas.

5.4 CONCLUSÕES

O extrato aquoso da fitomassa de capim-annoni-2 incubada por um período de 10 dias apresentou concentração de $0,75 \text{ gL}^{-1}$, o que equivale a 1,35 % da massa seca da parte aérea.

Dentre as espécies avaliadas, a alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca) foi a mais sensível ao extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni, pois tanto o processo germinativo quanto o desenvolvimento de plântulas foram afetados negativamente.

A braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) teve seu processo germinativo favorecido pela presença de extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni, mas as plântulas sofreram redução no seu desenvolvimento.

O trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) apresentou insensibilidade ao extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni no processo germinativo, mas o desenvolvimento de plântulas foi comprometido.

6 INFLUÊNCIA DE PERÍODOS DE DEGRADAÇÃO NA FITOTOXICIDADE DA FITOMASSA DE CAPIM-ANNONI-2 E MONITORAMENTO DA DINÂMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

RESUMO

Eragrostis plana é uma gramínea exótica conhecida popularmente como capim-annoni-2 e é considerada planta invasora de difícil controle em pastagens da Região Sul do Brasil. Os objetivos do presente trabalho foram determinar a fitotoxicidade do extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2 sobre plântulas de trigo, por períodos de incubação entre 1-21 dias, determinar o pH e a condutividade elétrica e identificar e quantificar os compostos presentes. A simulação da degradação da fitomassa seca da parte aérea de capim-annoni-2, do solo e fitomassa seca + solo foi realizada incubando o material, com água destilada, por períodos de 1 a 21 dias, em ambiente sem luz e com temperatura controlada. O processo de extração foi realizado utilizando água como solvente. A determinação dos fenóis totais no extrato foi realizada com espectrofotometria, enquanto a tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos com cromatografia líquida de alta eficiência. Os bioensaios de avaliação da fitotoxicidade do extrato sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo foram conduzidos em câmara de crescimento, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os sete tratamentos constituíram no extrato aquoso obtido em seis períodos de incubação diferentes mais testemunha com água destilada, para fitomassa de parte aérea de capim-annoni-2, fitomassa + solo e solo. Os maiores efeitos fitotóxicos sobre radículas de plântulas de trigo foram observadas nos tratamentos fitomassa e fitomassa + solo, nos dias 1 e 10 e 1, 3, 10 e 14, respectivamente, enquanto os maiores efeitos fitotóxicos para o comprimento de hipocótilo foram observados nos tratamentos fitomassa e fitomassa + solo nos dias 10 e 14 e 1, 3, 10, 14 e 21, respectivamente. O tratamento com solo promoveu o crescimento de radículas e hipocótilos em maior proporção do que os da testemunha do 1º até o 14º dia. Os maiores valores de pH foram registrados para os tratamentos fitomassa seca e fitomassa seca + solo, enquanto os maiores valores de condutividade elétrica foram registrados no tratamento fitomassa seca, seguido do tratamento fitomassa seca + solo, que apresentaram diferença em relação ao tratamento solo em todos os períodos de degradação. As concentrações de fenóis totais em todos os tratamentos foram maiores nos primeiros dias e diminuíram progressivamente.

Palavras-chave: Inibição. Alelopatia. Resíduos de plantas.

ABSTRACT

Eragrostis plana is an exotic species known popularly as South African lovegrass and is considered a difficult to control weed in southern Brazil pasture lands. The objectives of the present work were to determine the phytotoxicity of aqueous extract of the degraded straw of South African lovegrass on wheat seedlings, by incubation periods between 1-21 days, evaluate pH and electrical conductivity, and to identify and quantify the present compounds. The simulation of the South African lovegrass dry shots degradation, soil and dry matter + soil, was performed by incubating the material, moistened with distilled water, for periods from the 1st to 21th days in a dark and

temperature-controlled environment. The extraction process was performed using water as solvent. The determination of the total phenols in the extract was performed with spectrophotometry, while the attempt to identify and quantify phenolic compounds with high performance liquid chromatography. The bioassays evaluating the phytotoxicity of the extract on the development of wheat seedlings were conducted in BOD in a completely randomized design with four replicates. The seven treatments constituted in the aqueous extract obtained in six different incubation periods plus control with distilled water, for the shoot biomass of South African lovegrass, biomass + soil and soil. The phytotoxicity for rootlets of wheat seedlings were registered in the treatments straw and straw + soil on days 1 and 10 and 1, 3, 10 and 14 days, respectively. As for the length of hypocotyl the highest phytotoxicity were observed in treatments straw and straw + soil on 10 and 14, and on 1, 3, 10, 14 and 21 days, respectively. The soil treatment showed rootlets and hypocotyls bigger than control from the 1st to the 14th day. The higher pH values were recorded for the treatments straw and straw + soil, while the highest electrical conductivity values were recorded in the treatment straw, followed by treatment straw + soil, which showed a big difference for soil treatment in all periods degradation. The total phenolic concentrations in all degraded materials were higher on the first days and gradually decreased.

Keywords: Inhibition. Allelopathy. Plant residues.

6.1 INTRODUÇÃO

A relação entre plantas mediada pela produção e liberação no ambiente de compostos químicos tóxicos é denominada de alelopatia. Este termo foi cunhado pelo botânico tcheco-austríaco Hans Molish (1856-1937), que foi professor emérito e diretor do Instituto de Fisiologia Vegetal da Universidade de Viena, em um de seus livros (*Der Einfluß einer Pflanze auf die andere Allelopathie*), após ter estudado por anos as interações entre espécies vegetais (MOLISCH, 2001).

A degradação do tecido de plantas é um fenômeno que pode ocasionar a liberação de aleloquímicos, como os fenóis (WOJCIK-WOJTKOWIAK et al., 1990). Essas substâncias, por sua vez, apresentam papel importante nas relações ecológicas entre populações vegetais, inibindo a presença de espécies sensíveis a elas. Essa inibição pode ocorrer mesmo quando os aleloquímicos fenólicos encontram-se em baixas concentrações, devido a efeitos aditivos e sinérgicos que ocorrem entre eles na solução do solo (BLUM, 1996; REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999).

Trabalhos anteriores apontam a necessidade de oxidação dos compostos fenólicos para que ocorra a expressão de sua atividade ecológica. Como consequência, esta atividade dos fenóis pode variar de acordo com a atividade de

enzimas e oxidantes, mesmo quando as concentrações e a variedade de compostos fenólicos são constantes. A ativação por oxidação pode explicar muito da variação observada entre indivíduos e ecossistemas (APPEL, 1993).

Atividade alelopática já foi atribuída ao capim-annoni-2 em trabalhos avaliando a bioatividade da fitomassa e de extratos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de espécies cultivadas e invasoras. Em um dos trabalhos pioneiros, Coelho (1986) identificou efeito deletério do solo de área contaminada com capim-annoni-2 na germinação e no desenvolvimento de plântulas de trevo-branco (*Trifolium repens*) e no desenvolvimento de plântulas de azevém (*Lolium multiflorum*).

A fitomassa de capim-annoni-2 também diminuiu a germinação de grama batatais (*Paspalum notatum*) e setária (*Setaria sphacelata*) (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008). Extratos da parte aérea e raízes prejudicaram o desenvolvimento de plântulas de trevo branco (*T. repens*) (FAVARETTO et al., 2011). As espécies invasoras corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) também apresentaram redução na germinação e no desenvolvimento de plântulas nos tratamentos com extratos da parte aérea e do sistema radicular do capim-annoni-2 (DALBOSCO, 2013; SILVA, 2014).

No capítulo anterior, organizado para identificar a fitotoxicidade e quantificar os fenóis totais no extrato aquoso da fitomassa degradada de capim-annoni-2, por período de 10 dias, foi demonstrado que alfafa (*Medicago sativa* cv. Monarca), braquiária brizanta (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) e trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara) sofreram redução no desenvolvimento de plântulas, e a fitomassa degradada por 10 dias liberou 0,7 g de fenóis por g de resíduo. Trabalho investigando os compostos presentes nas plantas registraram a presença de ácido ferúlico, caféico, vanílico e p-cumárico em extratos de folhas e raízes e catequina e epicatequina em extratos de folhas (FAVARETTO et al., 2015a). Também foram identificados um triacilglicerol e um rotenóide em frações do extrato de acetato de etila (KLEIN, 2015).

A toxicidade de compostos fenólicos costuma ser maior no desenvolvimento de plântulas do que na germinação de sementes. Trabalhos já reportaram a ação de ácidos fenólicos no comportamento de hormônios vegetais, na absorção de minerais, no balanço hídrico da planta, no funcionamento dos estômatos,

na fotossíntese, na respiração, na síntese de determinados compostos orgânicos e também no fluxo de carbono (EINHELLIG, 1996, 2004).

Considerando isso, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito dos extratos aquosos da fitomassa degradada de capim-annoni-2, isolada ou associada a solo, sob diferentes tempos de incubação sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo e identificar e quantificar compostos fenólicos nos extratos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Preparação do material para a simulação de degradação

A fitomassa da parte aérea de 200 plantas de capim-annoni em final de ciclo reprodutivo foi coletada aleatoriamente em área infestada no município de Abelardo Luz (SC) (coordenadas: -26.527820, -52.255808), no mês de abril de 2015. As plantas foram cortadas manualmente a 1 cm sobre a superfície do solo e a parte aérea amostrada foi mantida em congelador a -26 ± 2 °C até o momento de secagem. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C por 72 horas no mês de maio de 2015. Logo após a secagem o material vegetal foi moído em moinho tipo Wiley (tela de 2 mm) e acondicionado em frascos de vidro (500 mL) com tampa e lacrados com filme plástico para evitar troca de umidade com o ambiente externo.

O solo utilizado no experimento foi obtido de área de pastagem de braquiária (*Urochloa brizantha*) que não foi explorada para produção agropecuária nos quatro anos anteriores à coleta e que não se encontrava contaminada com capim-annoni-2 (coordenadas: -25.444292, -52.445915), na área experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul Campus de Laranjeiras do Sul (PR) no mês de maio de 2015. Aproximadamente 1 kg de Latossolo Vermelho distroférico, de um retângulo com 10 cm de profundidade foi amostrado utilizando pá. O solo coletado foi seco em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C por 72 horas. Depois da secagem, o solo foi moído utilizando gral e pistilo de cerâmica e posteriormente passado em peneira (2 mm) para remoção de raízes. O solo seco, moído e peneirado foi armazenado em frascos de vidro de 500 mL até a instalação do experimento.

Para instalação da parte do experimento que simula a degradação do material (fitomassa, fitomassa + solo e solo) foram utilizados frascos de vidro de 500 mL e tampas com três furos de 2 mm para permitir trocas gasosas. O tratamento

fitomassa, recebeu 25 g de fitomassa seca de capim-annoni-2 e 75 mL de água destilada. O tratamento fitomassa + solo recebeu 25 g de fitomassa seca de capim-annoni-2, 25 g de solo e 82,5 mL de água destilada. O tratamento solo recebeu 25 g de solo e 7,5 mL de água destilada para atingir a capacidade de campo. Depois da montagem dos vidros com o material a ser degradado, os mesmos foram incubados em sala escura com temperatura controlada (18 °C) nos períodos de degradação de 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias. A massa de água perdida diariamente foi repostada, utilizando balança para determinar a massa perdida por evaporação.

6.2.2 Obtenção do extrato aquoso do material degradado

Foram avaliados sete tratamentos, que constituíram no extrato aquoso obtido em seis períodos de incubação diferentes mais testemunha com água destilada, para fitomassa de parte aérea de capim-annoni-2, fitomassa + solo e solo.

Para obtenção dos extratos aquosos, foram adicionados 340, 350 e 290 mL de água destilada às amostras de fitomassa, fitomassa + solo e solo, respectivamente. A água foi adicionada diretamente nos vidros em que o material estava incubado e baqueta foi utilizada para auxiliar na mistura inicial do material degradado com a água. Os vidros foram fechados com tampas sem furos e agitados em agitador orbital incubadora (tipo *shaker*) modelo Star FT 38 marca Fortinox a 200 rpm por 10 minutos a 25 °C.

O material foi então deixado para descansar por 5 minutos antes de ser filtrado em funil de vidro com gaze. A parte líquida obtida foi centrifugada a 3.900 rpm por 40 minutos a 25 °C, utilizando centrifuga modelo 3-16KL marca Sigma®. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro (poros de 25 µm) e a quantidade de solução recuperada foi de aproximadamente 270 mL. Cada extrato foi fracionado em três porções, para o bioensaio, para a determinação de fenóis totais, pH e condutividade elétrica e outra para análise cromatográfica. Os extratos obtidos dos materiais degradados foram armazenados sob refrigeração por 1 dia e deixados por 3 horas em temperatura ambiente antes de sua utilização no bioensaio de fitotoxicidade.

6.2.3 Bioensaio de fitotoxicidade

No bioensaio para testar a fitotoxicidade dos extratos degradados foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As unidades

experimentais consistiram de caixas do tipo Gerbox, forradas com duas camadas de papel mata borrão, que receberam 3,7 mL de extrato aquoso ou água destilada (testemunha) e 20 plântulas de trigo (*Triticum aestivum* cv. IPR Catuara).

As sementes básicas de trigo foram obtidas por doação do Instituto Agrônomo do Paraná, sendo mantidas refrigeradas até o momento da utilização. Para a obtenção das plântulas, cerca de 5.000 sementes foram colocadas para germinar em bandejas plásticas forradas com papel mata borrão umedecidos com 2,5 vezes sua massa com água destilada. As bandejas foram envoltas em papel alumínio para evitar a exposição das plântulas a luz e incubadas em BOD modelo BF2 CGFP 295 marca Biofoco com temperatura constante de 20 °C (BRASIL, 2009). O papel mata-borrão foi mantido úmido durante o período de incubação com adição de água destilada. Cerca de 72 horas após o início da incubação, grande parte das plântulas de trigo apresentavam o comprimento de radícula desejado para implantação do bioensaio. A classificação foi realizada separando 1.440 plântulas com comprimento de radícula entre 5 e 7 mm de comprimento. As plântulas de trigo foram dispostas nas Gerbox, que foram envoltas em papel alumínio e incubadas em câmaras do tipo BOD a 20 °C por 48 horas. Todo o processo para obtenção das plântulas e sua manipulação foi realizado em sala utilizando luz verde a fim de evitar a ativação do fitocromo.

Após os períodos de incubação, as plântulas tiveram seu comprimento de radícula e hipocótilo aferidos com a utilização de paquímetro digital modelo PDV1500 marca Vonder®. A média do comprimento de radícula e do hipocótilo das 20 plântulas de cada repetição compuseram o valor que foi utilizado na análise estatística.

6.2.4 Determinação do pH, da condutividade elétrica e de fenóis totais

Os extratos obtidos com os diferentes materiais e períodos de degradação tiveram seu pH e condutividade elétrica determinados com auxílio de pHmetro modelo mPA-210 marca MS Tecnopron e condutímetro modelo mCA 150 marca MS Tecnopron, sendo que as leituras foram realizadas com as amostras em temperatura ambiente (~25 °C).

Para a determinação de fenóis totais foram realizados processos de preparação de amostra e extração. Foram adicionados 75 mL de acetona PA a 25 mL de extrato, sendo que esta mistura foi agitada por 12 horas com uso de agitador

magnético modelo C-MAG HS7 marca Ika[®]. Posteriormente a solução foi filtrada com papel filtro (poros de 25 µm) em vácuo para separação de proteínas e lipídios, sendo que este sobrenadante foi descartado. A acetona da solução foi removida no evaporador rotativo modelo BT351 marca Biotech a 40 °C. O extrato límpido foi então fracionado três vezes com 50 mL de hexano PA, sendo a fração hexânica descartada e mais três vezes com 50 mL de éter dietílico PA. A fração etérea foi seca com uma ponta de espátula de Na₂SO₄ e colocada em rotoevaporador a 40 °C para evaporação do éter. O extrato obtido foi pesado.

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, marca Dinâmica, adaptando a metodologia proposta por López e Juan (2013). A constituição das cubetas para leitura no espectrofotômetro foi realizada com 100 µL do extrato, 600 µL de NaCO₃ (7,5 %), 700 µL de água destilada e 200 µL de reagente Folin-Ciocalteu, com essa mistura sendo aquecida a 50 °C por 10 minutos e diluída com 1,5 mL de água destilada antes da leitura no espectrofotômetro modelo 1600UV marca Nova. A curva de calibração do espectrofotômetro foi realizada com a preparação de soluções com 0, 10, 20, 30 e 40 µg.mL⁻¹ de ácido gálico PA. As substâncias fenólicas presentes na amostra avaliada foram reportadas em equivalente de microgramas de ácido gálico por mililitro de extrato aquoso.

6.2.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato da fitomassa degradada

Para a análise do comportamento dos compostos fenólicos nos diferentes períodos de degradação foram utilizadas as amostras dos extratos etéreos descritos no item anterior para quantificação de fenóis totais. Um volume de 200 µL do extrato etéreo de cada amostra foi misturado a 1,8 µL de álcool metílico grau espectroscópico marca Sigma-Aldrich[®]. As amostras foram então filtradas em filtro de membrana modelo PES 2204525 600C marca Analítica com poros de 0,45 µm para posterior injeção de volume de 10 µL de cada amostra no cromatógrafo líquido, modelo 920-R6 marca Varian[®], equipado com coluna ACE[®] C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) conforme metodologia proposta por Silva (2016). Os padrões marca Sigma-Aldrich[®] com pureza igual ou superior a 99,9 % foram injetados em misturas no cromatógrafo líquido: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido salicílico, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, resveratrol e quercetina. Como fase móvel foi utilizado gradiente, composto por duas misturas de

solventes: A) água e ácido acético (98:2) e B) água, ácido acético e acetonitrila (58:2:40). O sistema foi mantido a 30 °C com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

6.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$), e posterior análise de regressão ou teste de comparação múltipla de médias, utilizando o software Genes (CRUZ, 2013). Quando pertinente, foram adotados os modelos mais simples capazes de se ajustar aos dados observados para permitir previsão que resultou no menor valor de soma de quadrados do resíduo. Quando não foi possível ajustar as médias a modelos de regressão as médias dos diferentes tratamentos foram ligadas por linhas.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância para as variáveis comprimento de radícula e hipocótilo demonstraram significância ($p < 0,01$) para a interação dos fatores material (fitomassa, fitomassa + solo e solo) e períodos de degradação (1, 3, 7, 10, 14, 21 dias).

6.3.1 Efeito do extrato aquoso no comprimento de radícula

Foram efetuadas análises de regressão dos períodos de degradação do material dentro de cada nível de material degradado. Não foram encontrados modelos para adequada representação dos resultados nos tratamentos com fitomassa (Figura 6.1 A) e fitomassa + solo (Figura 6.1 B), por isso os pontos foram ligados. O modelo polinomial de segundo grau ($Y = a + b \cdot X + c \cdot X^2$) foi aquele que melhor determinou a relação entre os períodos de decomposição do tratamento solo e o comprimento de radícula de trigo (Figura 6.1 C).

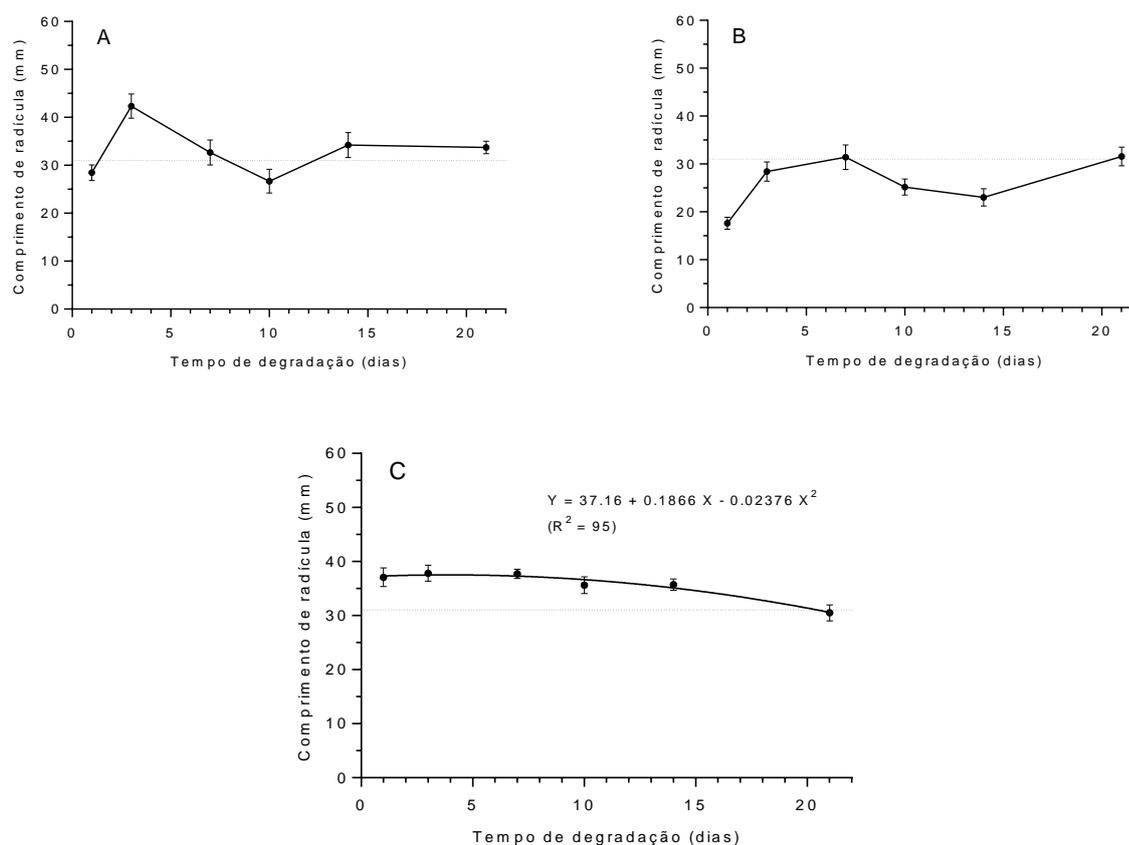


Figura 6.1 – Comprimento da radícula de plântulas de trigo nos tratamentos com extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) em diferentes períodos de degradação (dias) em relação a testemunha com água destilada. Os pontos representam as médias dos tratamentos e o erro padrão a variabilidade entre as repetições. A curva em (C) representa modelo polinomial de segunda ordem; onde Y é o comprimento da radícula em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

Os extratos aquosos de fitomassa e fitomassa + solo foram os únicos tratamentos que ocasionaram reduções no comprimento de radícula em determinados tempos de degradação, quando comparados à testemunha. O extrato aquoso de solo apresentou efeito positivo sobre o comprimento de radícula das plântulas de trigo durante quase todo o período de degradação, chegando a comprimentos próximos à testemunha no 21º dia de degradação.

A redução no comprimento de radícula de plântulas de *Arabidopsis thaliana* já foi atribuída à catequina em trabalho avaliando diferentes concentrações (DUKE et al., 2009). Apesar de ser atribuído à catequina propriedades antioxidantes quando testada isoladamente, resultados encontrados por Sugihara et al. (2001) e Kumamoto et al. (2001) sugerem que a presença de íons como o Ferro (Fe^{2+})

modifiquem esta característica e confirmam às catequinas atividades pró-oxidativas. O Latossolo Vermelho distroférico do Paraná apresenta elevadas concentrações de ferro, em virtude das características químicas do material de origem basáltico (MELO et al., 2008). Por isso, teoriza-se que o ferro presente no solo coletado, em concentração de 91 mg.dm^{-3} , possa ter influenciado na maior fitotoxicidade, observada no tratamento fitomassa + solo.

Durante quatro períodos de degradação (3, 7, 14 e 21 dias), o extrato aquoso da fitomassa proporcionou incremento do tamanho de radícula das plântulas de trigo em relação à testemunha. No 1° e 10° dia de degradação, no entanto, seu efeito foi negativo, diminuindo em aproximadamente 10 % o comprimento de radícula em relação à testemunha.

A presença do extrato aquoso da fitomassa + solo resultou em plântulas de trigo com comprimentos de radícula similares aos observados na testemunha apenas no 7° e 21° dias de degradação. Nos demais períodos de degradação, o efeito do extrato aquoso da fitomassa + solo ocasionou redução no comprimento da radícula em relação à testemunha, que chegou a ser maior que 40 % no 1° dia de degradação.

O extrato aquoso de solo apresentou efeito positivo no crescimento das radículas de trigo, com valores maiores em relação à testemunha durante quase todo período de degradação avaliado. Do 1° ao 7° dia de degradação o comprimento de radícula foi cerca de 20 % maior do que o da testemunha e entre o 10° e o 14° dia de degradação caiu para 15 %, chegando a percentuais próximos à testemunha no 21° dia.

6.3.2 Efeito do extrato aquoso no comprimento de hipocótilo

Assim como observado para a variável comprimento de radícula, a análise de variância também indicou a interação entre os fatores para o comprimento de hipocótilo. Por isso, buscou-se obter regressões entre os níveis do fator período de degradação do material e cada nível de material degradado. Para comprimento de hipocótilo, também não foram encontrados modelos para adequada representação dos resultados nos tratamentos com fitomassa e fitomassa + solo, e assim os pontos foram ligados. O modelo polinomial de segundo grau ($Y = a + b*X + c*X^2$) foi aquele que melhor determinou a relação entre os períodos de decomposição do tratamento solo e o comprimento de hipocótilo de trigo (Figura 6.2 C).

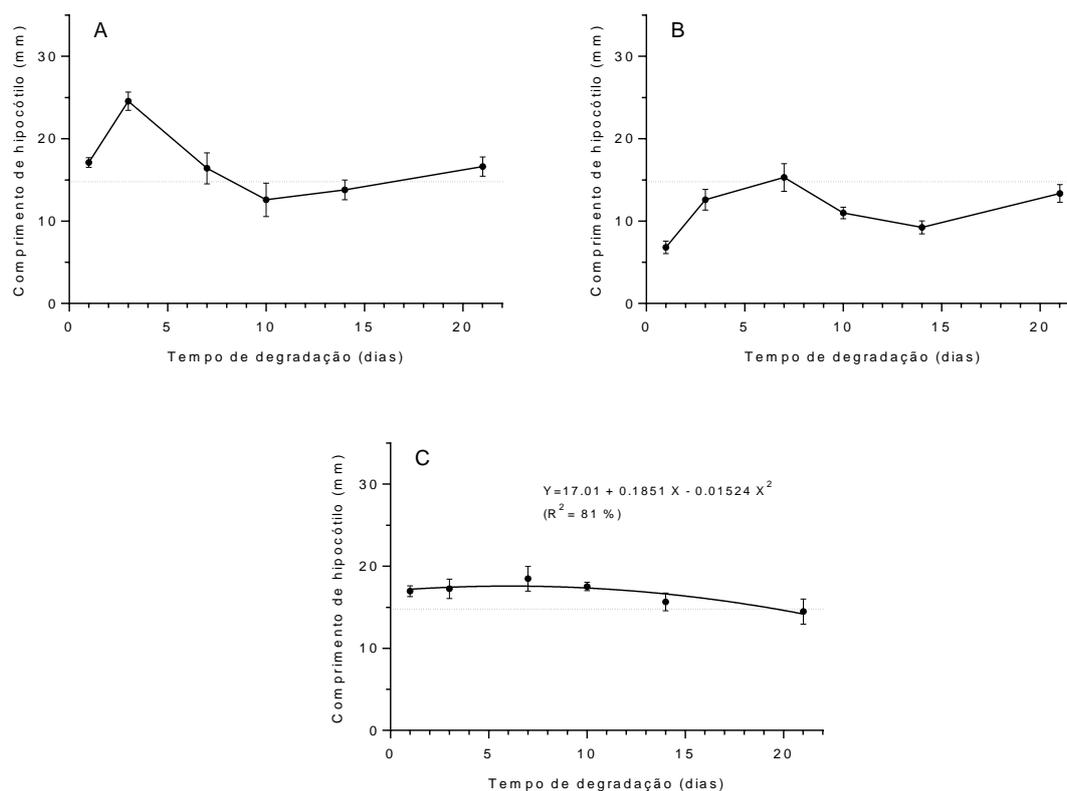


Figura 6.2 – Comprimento de hipocótilo de plântulas de trigo nos tratamentos com extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) em diferentes períodos de degradação (dias) em relação a testemunha com água destilada. Os pontos representam as médias dos tratamentos e o erro padrão a variabilidade entre as repetições. A curva em (C) representa modelo polinomial de segunda ordem; onde Y é o comprimento do hipocótilo em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

De maneira geral, os resultados observados nos tratamentos sobre o comprimento de radícula apresentaram similaridade aos observados no comprimento do hipocótilo de plântulas de trigo. Os tratamentos com fitomassa e fitomassa + solo foram novamente aqueles que reduziram mais o comprimento de hipocótilo em comparação com a testemunha com água destilada e ao tratamento solo.

O extrato aquoso da fitomassa degradada apresentou valores de comprimento de hipocótilo menores do que a testemunha no 10º e no 14º dia de degradação, atingindo redução de cerca de 15 % em relação à testemunha no 10º dia. Entretanto, nos demais períodos avaliados a fitomassa apresentou valores de comprimento de hipocótilo superiores aos observados na testemunha, chegando a ser 60 % superior no 3º dia de degradação (Figura 6.2 A).

O extrato aquoso da fitomassa + solo apresentou valores de comprimento de hipocótilo inferiores à testemunha em quase todos os períodos de degradação avaliados, sendo cerca de 50 % inferior no 1º dia de degradação. No entanto, a diferença em relação a testemunha variou entre os períodos, chegando a valores próximos aos observados na testemunha no 7º dia de degradação (Figura 6.2 B).

O extrato aquoso do solo resultou em comprimentos de hipocótilo de trigo superiores aos observados na testemunha em quase todos os períodos de degradação. O comprimento de hipocótilo chegou a ser mais de 20 % superior ao observado na testemunha no 7º dia de degradação.

6.3.3 pH e condutividade elétrica

As propriedades físico químicas da solução podem ser características determinantes sobre a atividade, retenção no solo e degradação dos compostos fenólicos. A tentativa de compreensão e previsão das consequências oriundas da presença de compostos fenólicos nos sistemas ecológicos passa pela aferição da capacidade oxidativa do ambiente (APPEL, 1993).

Entre os diferentes períodos de degradação, os valores de pH do extrato aquoso da fitomassa degradada foram todos maiores que os observados no extrato da fitomassa + solo e solo (Tabela 6.1). O valor mais baixo de pH foi registrado no extrato aquoso de fitomassa + solo com um dia de degradação (4,62), enquanto o maior valor de pH foi registrado no extrato da fitomassa com sete dias de degradação (7,56).

Tabela 6.1. Valores de pH e de condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) dos extratos de fitomassa, fitomassa + solo e solo em diferentes períodos de incubação (dias) em temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Material | Tempo de incub. [Dias] | pH | Cond. Elétrica [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$] | pH Médio entre os períodos | Cond. Elétrica Média entre os períodos [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$] |
|------------------|------------------------|------|---|-------------------------------|---|
| Fitomassa | 1 | 5,38 | 1.563 | 6,85 \pm 0,32 ^{ns} | 1.312,50 \pm 72,88 a |
| | 3 | 7,13 | 1.213 | | |
| | 7 | 7,56 | 1.349 | | |
| | 10 | 7,38 | 1.470 | | |
| | 14 | 6,80 | 1.163 | | |
| | 21 | 6,82 | 1.117 | | |
| Fitomassa + Solo | 1 | 4,62 | 1.313 | 6,31 \pm 0,34 ^{ns} | 945,33 \pm 95,86 b |
| | 3 | 6,59 | 629 | | |
| | 7 | 6,64 | 881 | | |
| | 10 | 6,74 | 954 | | |
| | 14 | 6,65 | 1.082 | | |
| | 21 | 6,64 | 813 | | |
| Solo | 1 | 6,61 | 38 | 6,24 \pm 0,10 ^{ns} | 18,33 \pm 3,88 c |
| | 3 | 6,25 | 14 | | |
| | 7 | 6,37 | 17 | | |
| | 10 | 6,22 | 13 | | |
| | 14 | 6,08 | 15 | | |
| | 21 | 5,88 | 16 | | |

* Tratamentos com médias \pm erro padrão não ligadas por mesma letra nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ^{ns} Não significativo

Os valores médios de pH entre os diferentes períodos de incubação dos tratamentos fitomassa + solo e solo foram aproximadamente 8 e 9 % inferiores aos valores de pH registrados para o tratamento fitomassa, respectivamente. Apesar das diferenças de pH observadas, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Para a variável condutividade elétrica, a média nos diferentes períodos de degradação dos valores observados no tratamento fitomassa também foi superior aos demais. Os valores médios nos diferentes períodos de incubação para condutividade elétrica nos tratamentos fitomassa + solo e solo foram aproximadamente 28 e 99 % inferiores aos registrados no tratamento fitomassa, respectivamente. Todas estas médias diferiram entre si pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey.

O incremento da condutividade elétrica ocasionado pela fitomassa já havia sido observado em outro trabalho, em que foi constatado aumento na condutividade elétrica no tratamento fitomassa de arruda (*Ruta graveolens*) misturado ao solo quando comparado ao tratamento solo sem a presença do material vegetal (OLIVA et al., 2002).

Os maiores valores de condutividade elétrica foram registrados nos extratos aquosos da fitomassa, fitomassa + solo apresentou valores próximos ao primeiro e o tratamento apenas com solo registrou valores menores que os demais.

A condutividade elétrica é uma variável que indica a presença de íons e sais na solução, e pode estar associada à fitotoxicidade e ao potencial osmótico da solução (SUITS et al., 2008). Em trabalho estudando a fitotoxicidade de composto utilizado para a fertilização de solos, a condutividade elétrica foi apontada como uma das variáveis importantes para determinar a maturação do composto e evitar a ocorrência de fitotoxicidade (ASLAM; HORWATH; VANDERGHEYNST, 2008). Em estudo sobre diferentes formas de tratamento de água poluída, a fitotoxicidade foi relacionada com a condutividade elétrica (GONZÁLEZ et al., 2012). Em estudo realizado por Lawley, Teasdale e WEIL (2012) sobre o mecanismo envolvido na supressão de plantas invasoras pela cobertura do solo com resíduos vegetais, os autores verificaram associação entre a condutividade elétrica dos extratos das plantas e o potencial alelopático.

Os valores de condutividade elétrica aumentam com a concentração de íons ou sais na solução. No presente trabalho, teoriza-se que os valores de condutividade elétrica possam ter sido aumentados pela mineralização de nitrogênio presente na fitomassa do capim-annoni-2 ou pela produção de ácidos orgânicos a partir da degradação da fitomassa e da sua interação com o solo, entre outros fatores. No entanto, pela subjetividade da variável, é impossível determinar quais íons ou sais presentes na fitomassa e na fitomassa + solo incubados estariam envolvidos com a supressão do desenvolvimento inicial de trigo.

6.3.4 Fenóis totais

Em todos os tratamentos, a concentração de fenóis totais decresceu linearmente com o decorrer do tempo de incubação (Figura 6.3). A comparação dos tratamentos demonstra concentrações de fenóis totais similares tanto no primeiro quanto após o décimo quarto dia de degradação. A fitomassa foi o tratamento que apresentou concentração de fenóis totais maior até o décimo dia após o início da degradação, atingindo valores similares aos demais tratamentos após o décimo quarto dia.

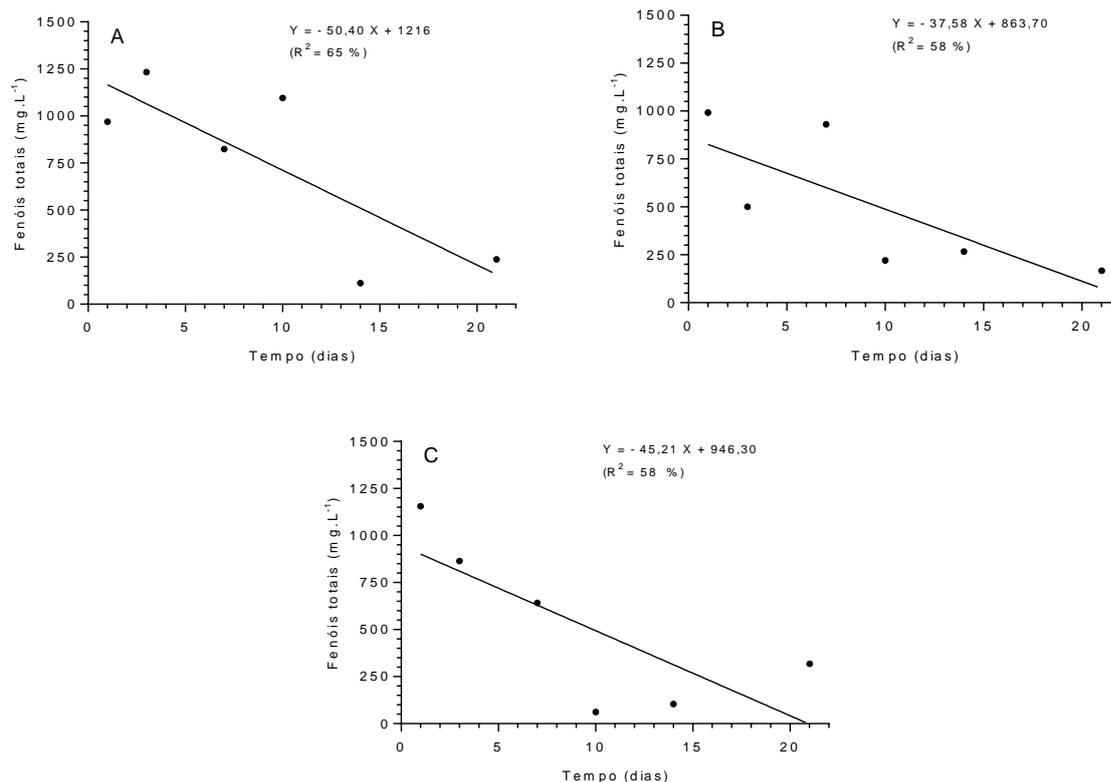


Figura 6.3 – Concentração de fenóis totais (mg.L⁻¹) no extrato aquoso de fitomassa (A), fitomassa + solo (B) e solo (C) do primeiro ao vigésimo primeiro dia de degradação. As curvas representam modelos polinomiais de segunda ordem; onde Y é a concentração de fenóis totais (mg.L⁻¹) em determinado tempo (dias) de degradação do material X. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

Através da interpolação das equações de regressão nos diferentes tratamentos, foi possível estimar o período necessário para que as concentrações de fenóis totais atingissem zero. Enquanto para o tratamento fitomassa o tempo necessário foi de aproximadamente 24 dias, o tratamento fitomassa + solo e solo foram menores, com valores de aproximadamente 23 e 21 dias, respectivamente. Em um estudo com adição de resíduos de plantas contendo elevadas concentrações de ácidos fenólicos ao solo e posterior incubação por diferentes períodos, Martens (2002) observou que o ácido ferúlico, *trans*-cinâmico e cumarina mantiveram praticamente intactas suas concentrações e estruturas por um período de nove dias. No entanto, vários fatores, como enzimas fenol-oxidase, podem ocasionar a diminuição da concentração de compostos fenólicos (PIND; FREEMAN; LOCK, 1994).

A análise entre os tratamentos permite observar tanto a influência positiva da fitomassa do capim-annoni-2 quanto a influência negativa do solo sobre a concentração dos fenóis totais. Isso porque as maiores concentrações foram

registradas nos tratamentos com fitomassa, diminuindo quando a fitomassa foi combinada com o solo. Destaca-se que, apesar do tratamento solo separadamente apresentar concentração de fenóis totais significativa, a combinação solo + fitomassa resultou em concentrações de fenóis totais praticamente iguais ao solo isoladamente, ao longo do período de degradação. Esse efeito desperta curiosidade, pois o tratamento que apresentou os maiores níveis de fitotoxicidade a plantas de trigo foi fitomassa + solo. A incorporação de restos de plantas de arruda (*Ruta graveolens*) ao solo resultou em elevada quantidade de compostos fenólicos solúveis em comparação ao solo sem o material vegetal (OLIVA et al., 2002).

Não foi observada relação entre a concentração de fenóis totais e a fitotoxicidade dos extratos, que apresentaram comportamentos independentes nos períodos de incubação. As dinâmicas na concentração dos fenóis totais das amostras, do pH da solução e da condutividade elétrica (cátions solúveis) sugerem a formação de fenolatos, principalmente no extrato aquoso de fitomassa + solo. Os fenolatos apresentam maior estabilidade que os compostos fenólicos e também podem apresentar toxicidade, dependendo do resultado da interação entre o composto fenólico e do cátion, podendo dar origem a quinonas, por exemplo (APPEL, 1993), ou alterando a sua atividade biológica (KUMAMOTO et al., 2001). Quando os compostos fenólicos são ionizados e formam fenolatos, podem ocorrer ligações iônicas, e quando o hidrogênio é removido do grupo fenoxil, este pode apresentar carga negativa. Esta reação é favorecida em condição de pH mais elevado, efeito que ocorre quando há incorporação do material vegetal de capim-annoni-2 ao solo (Tabela 6.1). Os íons fenolatos são altamente reativos porque eles já se apresentam ionizados (APPEL, 1993). Este fenômeno de quelação de composto fenólico é teoricamente o responsável pela maior toxicidade da catequina no solo do que em testes *in vitro* (INDERJIT et al., 2008).

Além disso, o pH do solo determina o tipo e a estabilidade das ligações formadas entre os compostos fenólicos e a matéria orgânica, afetando diretamente sua estabilidade (CASTELLS, 2008). Em pH maior que 8,0 existe tendência de que os compostos fenólicos formem ligações covalentes com a matéria orgânica, reduzindo a sua disponibilidade para absorção pelas plantas, enquanto em valores de pH menores geralmente ocorrem ligações de hidrogênio que são caracterizadas por menor força e maior reversibilidade (APPEL, 1993).

Apesar de todas as observações, a ausência de correlação entre a concentração de fenóis totais e a fitotoxicidade não permitiu concluir sobre a interação dos compostos fenólicos do extrato com o desenvolvimento de radícula e hipocótilo das plântulas de trigo. Para compreender a dinâmica de inibição observada, talvez sejam necessários trabalhos que permitam elucidar as transformações químicas que ocorrem nos extratos obtidos a partir da combinação de fitomassa e solo. Isso permitiria determinar a causalidade, por identificar as substâncias envolvidas na inibição do desenvolvimento de plântulas observada na combinação de fitomassa com solo.

6.3.5 Perfis cromatográficos dos extratos

Os compostos presentes nas amostras dos extratos etéreos não puderam ser devidamente identificados utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), provavelmente em função da baixa polaridade do éter dietílico utilizado para extração líquido-líquido. Problemas no uso de CLAE para identificação e quantificação de compostos fenólicos extraídos para determinação de fenóis totais por espectrometria são, infelizmente, comuns (WATERHOUSE, 2003). Solventes com maior polaridade, como acetato de etila ou álcool metílico talvez permitissem melhor extração dos compostos fenólicos e menor extração de compostos de baixa polaridade, como os obtidos utilizando éter dietílico, que comprometeram a separação dos analitos. No entanto, os cromatogramas obtidos permitiram demonstrar que houve degradação de compostos presentes nas amostras.

O extrato etéreo da fitomassa degradada sofreu as maiores modificações entre o 1° e o 7° dia de degradação. A partir do 7° dia os cromatogramas se parecem muito uns com os outros com a ocorrência de uma única modificação entre o 14° e o 21° dia de degradação (Figura 6.4).

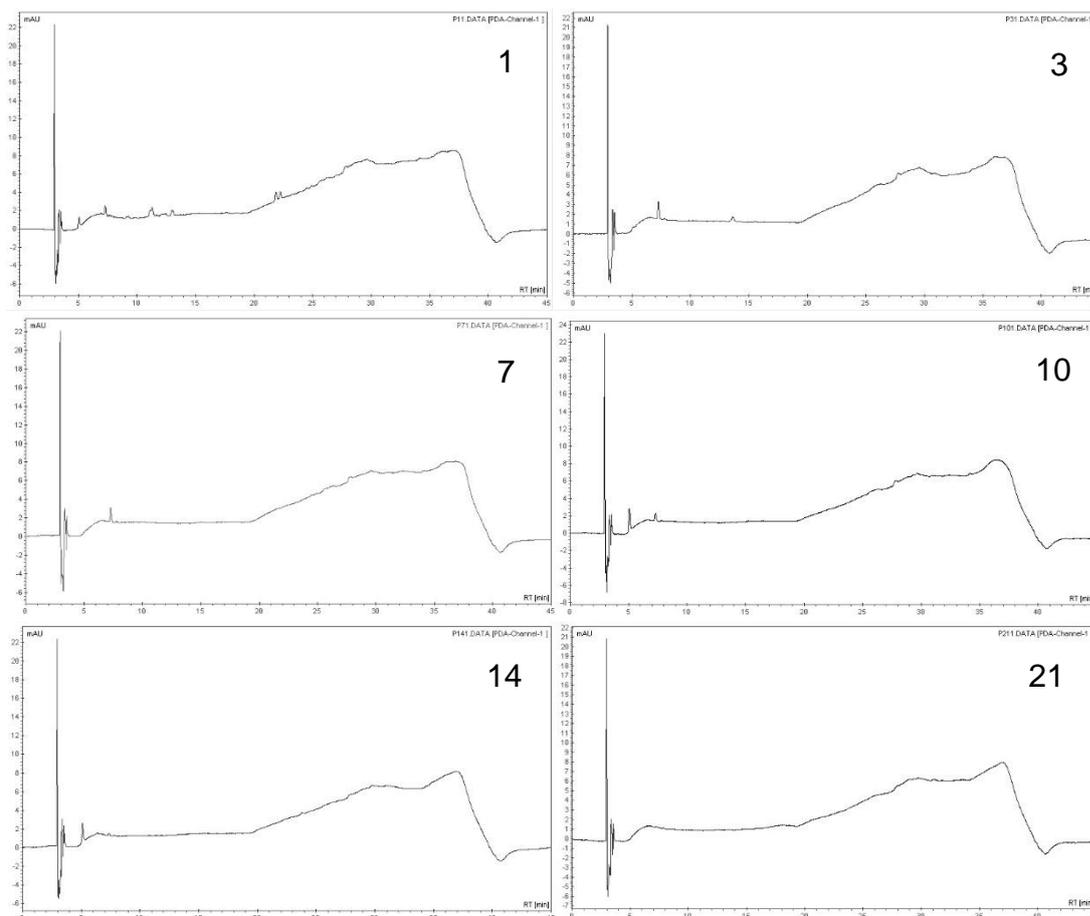


Figura 6.4 – Cromatogramas dos extratos etéreos da fitomassa degradada de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O primeiro e o décimo dia de degradação foram aqueles responsáveis pelos dois menores comprimentos de radícula de plântulas de trigo no tratamento em que foi incubada apenas a fitomassa (Figura 6.1 A). Estes períodos coincidiram com aqueles em que foram registradas as maiores condutividades elétricas. Estes dois períodos de degradação coincidiram também com o início da degradação dos compostos observado nos cromatogramas e o primeiro período subsequente em que não foram registradas mudanças entre os perfis cromatográficos. A partir do décimo dia de degradação a concentração de fenóis totais da fitomassa caiu de valores próximos de 1.000 mg.L^{-1} para valores de 112 e 238 mg.L^{-1} no décimo quarto e vigésimo primeiro dia. A partir do décimo dia de degradação também ocorreu diminuição na variação do pH do extrato da fitomassa.

Os cromatogramas dos extratos etéreos da fitomassa + solo degradados sofreram modificações principalmente entre o 1º e o 3º dia de degradação (Figura 6.5). A partir do 3º dia os cromatogramas foram similares uns com os outros, com a ocorrência de ligeiras e praticamente imperceptíveis modificações dos picos entre o 3º e o 21º dia de degradação.

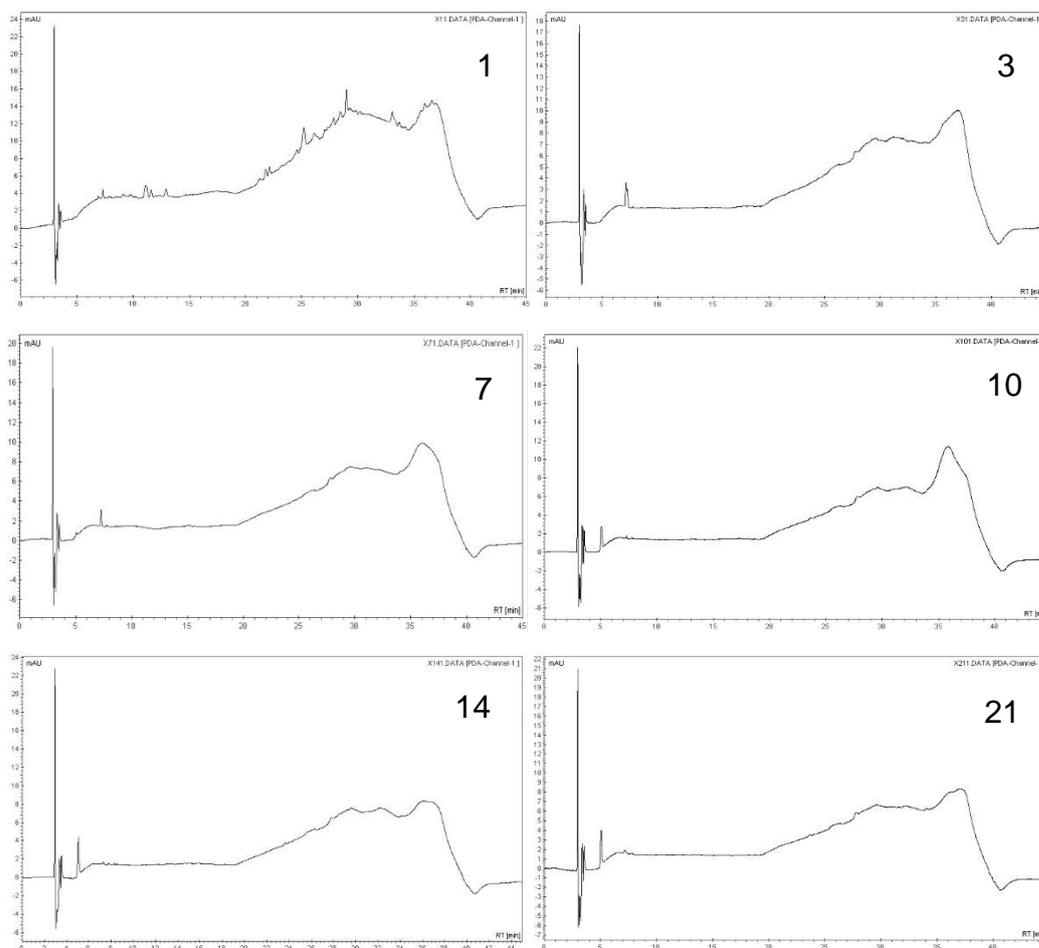


Figura 6.5 – Cromatogramas dos extratos etéreos da fitomassa degradada de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) com solo em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

O primeiro dia de degradação da fitomassa + solo coincidiu com aquele responsável pelos menores comprimentos de radícula e de hipocótilo de plântulas de trigo e com os maiores valores de condutividade elétrica e de fenóis totais. Já o terceiro dia de degradação foi o que apresentou apenas a quarta maior redução do comprimento de radícula de plântulas de trigo e foi o período com menor condutividade elétrica para fitomassa + solo.

O extrato etéreo do solo degradado sofreu poucas modificações, sendo que elas ocorreram entre o 1° e o 7° dia de degradação. A partir do 7° dia os cromatogramas se parecem muito uns com os outros, com a ocorrência de ligeiras e praticamente imperceptíveis modificações entre o 7° e o 21° dia de degradação (Figura 6.6). Porém, o efeito inibitório dos extratos ocorreu até o 10° e 15° dia de incubação, o que reforça a hipótese que o método de extração não foi adequado para detecção dos compostos ativos presentes nos extratos.

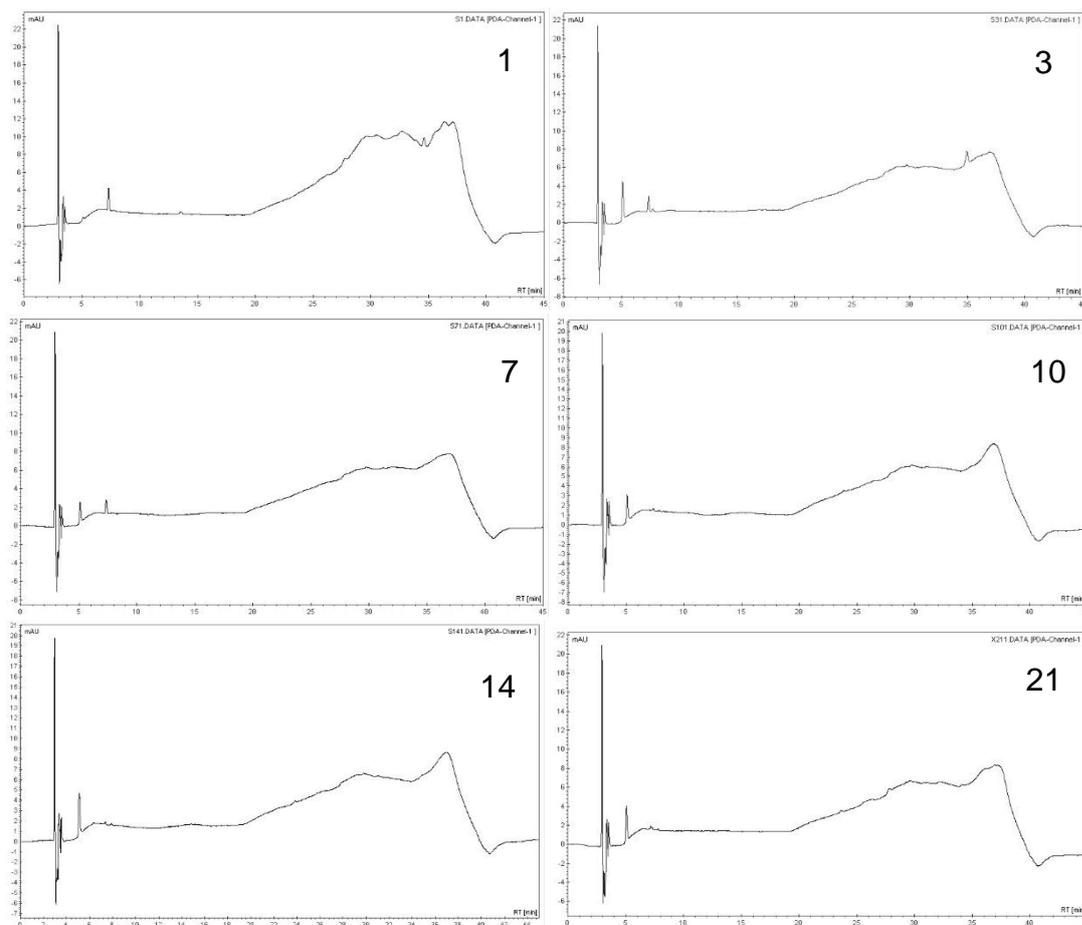


Figura 6.6 – Cromatogramas dos extratos etéreos do solo degradado em diferentes períodos: (1) um dia; (3) três dias; (7) sete dias; (10) dez dias; (14) quatorze dias, e; (21) vinte e um dias. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Entre o primeiro e o sétimo dia de degradação do solo foram registrados os maiores valores de comprimento de radícula de plântulas de trigo. Primeiro, terceiro e sétimo dias de degradação tiveram valores de fenóis totais de 1.156, 863 e 641 mg.L⁻¹, respectivamente, que são muito superiores aos valores observados no décimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias de degradação do solo (61, 104 e 318 mg.L⁻¹,

respectivamente). Devido à relação inversamente proporcional entre a condutividade elétrica e o comprimento de radícula de trigo, ela pode ser uma variável importante em trabalhos futuros.

6.4 CONCLUSÕES

As maiores fitotoxicidades às plântulas de trigo foram observadas nos extratos obtidos do tratamento de incubação de fitomassa de capim-annoni-2 com solo.

O extrato aquoso do solo foi o único que não apresentou fitotoxicidade ao longo do período de degradação para plântulas de trigo.

A condutividade elétrica é um indicador importante da presença de fitomassa nos extratos aquosos, fazendo com que os valores dessa variável fossem mais de 100 vezes superiores aos observados no extrato de solo em alguns períodos de incubação.

A determinação de fenóis totais não apresenta correlação direta com a fitotoxicidade de extratos aquosos de capim-annoni-2, não constituindo portanto, um parâmetro que explique os efeitos sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo.

7 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM POTENCIAL ALELOPÁTICO EM SOLO INFESTADO POR CAPIM-ANNONI-2

RESUMO

A espécie *Eragrostis plana*, conhecida popularmente como capim-annoni-2, é uma das plantas invasoras mais agressivas e de difícil controle nas áreas de pastagem da Região Sul do Brasil. Os objetivos do presente trabalho foram identificar e quantificar compostos fenólicos presentes no perfil do solo de área contaminada com o capim-annoni-2. O solo foi coletado em amostragem estratificada com três repetições de área contaminada e outra livre de capim-annoni-2, correspondendo a áreas adjacentes. A extração foi realizada com álcool metílico, enquanto a identificação e quantificação de compostos fenólicos com cromatografia de alta eficiência. No total, foram identificados quatro compostos fenólicos nas amostras da área contaminada: catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico. Todos estes compostos apresentam são potencialmente tóxicos sobre espécies vegetais, tendo sido reportados como aleloquímicos em outros trabalhos científicos. Catequina, epicatequina e ácido ferúlico apresentaram padrões de distribuição semelhantes no perfil do solo, com maiores concentrações detectadas na superfície e no lado oposto à planta, que indicam liberação para o solo através da degradação da sua parte aérea. O ácido cumárico apresentou maiores concentrações na superfície do solo no lado oposto a planta e na parte mais profunda do solo ao lado da planta, indicando liberação a partir da degradação da parte aérea e a partir do sistema radicular, respectivamente. Pelo menos outros quatro compostos foram frequentes nas amostras, mas não puderam ser identificados, indicando a necessidade de trabalhos futuros para sua determinação e quantificação. Outros trabalhos deveriam explorar a fitotoxicidade dos compostos identificados, isolados ou misturados, por meio de curvas de dose e resposta inibitória a espécies vegetais alvo.

Palavras-chave: Alelopatia. Fitotoxicidade. Catequina. Epicatequina. Ácido cumárico. Ácido ferúlico.

ABSTRACT

The *Eragrostis plana* species, popularly known as South African lovegrass, is one of the more aggressive and difficult to control pasture land weed in southern Brazil. The objectives of this study were to identify and quantify phenolic compounds present in the soil profile of a contaminated area with South African lovegrass. The soil was collected with a stratified sampling with three replicates from a contaminated area and from one free of South African lovegrass, corresponding to adjacent areas. The extraction was performed with methyl alcohol, while the identification and quantification of phenolic compounds with high efficiency chromatography. In total, there were identified four phenolic compounds in the samples of the contaminated area: catechin, epicatechin, coumaric acid and ferulic acid. All these compounds have potential for toxicity in plants, as it has already been reported as allelochemicals in other scientific papers. Catechin, epicatechin and ferulic acid showed similar distribution patterns in the soil profile, with higher concentrations being found on the surface and on the opposite side of the plant, indicating a release to the soil through the shoot degradation. Coumaric acid showed higher concentrations in the soil surface opposite to the plant

and in the deeper part of the soil on the plant side, indicating a release from the degradation of shoots and another from the root system, respectively. At least four other compounds were common in the samples, but could not be identified, indicating the need for further work to identify and quantify these compounds. Furthermore, other studies can explore the phytotoxicity of the identified compounds, alone or mixed, and construct dose response curves for the inhibition of another plant species.

Keywords: Allelopathy. Phytotoxicity. Catechin. Epicatechin. Coumaric acid. Ferulic acid.

7.1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é considerado uma das plantas daninhas exóticas mais agressivas das áreas de pastagens da região Sul do Brasil, ocupando área superior a um milhão de hectares (MEDEIROS; PILLAR; REIS, 2004). Ele também é encontrado nos países vizinhos Argentina e Uruguai (ZENNI; ZILLER, 2011). É uma espécie gramínea perene estival de verão de difícil manejo que se reproduz por sementes. Uma única planta produz milhares de sementes no final do verão que apresentam elevada viabilidade. O seu sucesso como invasora é atribuído à sua alta adaptabilidade a diferentes condições ambientais (MACEDO, 1993).

O controle do capim-annoni-2 com uso de herbicidas em áreas de pastagem não costuma ser estratégia eficiente em virtude da dificuldade em controlar plantas já estabelecidas em touceiras, condição que aumenta sua capacidade de rebrote (GOULART et al., 2009) e, principalmente, pela existência de bancos de sementes muito populosos, o que garante novos fluxos de emergência de plântulas, exigindo a adoção continuada de medidas de controle (MEDEIROS; FOCHT, 2007; REIS; COELHO, 2000). Nas comunidades vegetais, esta espécie pode se sobressair às demais por meio de relações de competição e alelopatia. Credita-se a ela a produção de aleloquímicos, que após serem liberados no ambiente apresentam efeito inibitório sobre plantas de outras espécies (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008).

A relação alelopática é um tipo de interação ecológica que geralmente é benéfica para a espécie produtora/doadora e prejudicial para a receptora (TREZZI et al., 2016). Os compostos alelopáticos podem ser liberados no ambiente de maneira ativa, por diferentes órgãos da planta, ou durante o processo de decomposição dos tecidos. Na maior parte dos casos, os aleloquímicos são absorvidos pela planta receptora a partir do solo. Vários estudos já comprovaram a acumulação de aleloquímicos no solo próximo à planta doadora, com aumento na acumulação de

compostos à medida que a planta se desenvolve (IANNUCCI et al., 2013). Ressalta-se que fatores edáficos como umidade, disponibilidade de nutrientes, temperatura e teor de matéria orgânica, além dos biológicos, podem influenciar a disponibilidade e a ação dos aleloquímicos presentes no solo (INDERJIT, 1996).

A maior parte dos fenóis, por exemplo, é adsorvida pelas ligações de hidrogênio na superfície das partículas do solo (BOYD, 1982). Os ácidos fenólicos hidroxibenzóico, vanílico, cumárico e ferúlico possuem elevada afinidade com sítios específicos do solo, especialmente com a matéria orgânica. Por isso, a adsorção destes compostos na matriz do solo tende a diminuir com a diminuição do teor de matéria orgânica (THARAYIL; BHOWMIK; XING, 2006). Além disso, a adsorção de fenóis apresenta correlação inversamente proporcional ao número de compostos fenólicos presentes na solução devido ao aumento do efeito competitivo. Ou seja, a presença de um composto na solução do solo pode alterar a adsorção de outro à matriz (BOYD, 1982).

Quando absorvidos pelas plantas receptoras, os aleloquímicos podem desencadear mecanismos de ação capazes de alterar processos vitais como respiração, fotossíntese, divisão e alongamento celular, biossíntese de proteínas, fluidez da membrana celular e atividades enzimáticas, entre outros (FIELD; JORDÁN; OSBOURN, 2006; TREZZI et al., 2016).

Estudos realizados por Favaretto et al. (2015) e por Fiorenza et al. (2016) identificaram a presença de compostos fenólicos com potencial aleloquímico na parte aérea e no sistema radicular do capim-annoni-2. Este grupo de compostos químicos é considerado um dos mais importantes e comuns em interações alelopáticas entre espécies vegetais (LI et al., 2010). Os compostos fenólicos são biossintetizados pela rota dos fenilpropanóides à partir da fenilalanina (EINHELLIG, 2004).

Os compostos fenólicos podem ser detectados no solo na forma livre ou adsorvida. Neste ambiente, podem passar por transformações em sua estrutura antes de serem absorvidos pela planta receptora, o que coloca o solo como protagonista na determinação do comportamento dos aleloquímicos. Desta forma, a extração e identificação de compostos fitotóxicos presentes nos tecidos da planta doadora não demonstram por si só o seu papel em interações alelopáticas. Talvez por isso, estudos envolvendo o solo sejam tão promissores na área de alelopatia, pois podem permitir elucidar se os compostos produzidos pelo metabolismo secundário das espécies

produtoras estão de fato disponíveis no ambiente, e em qual concentração, para serem absorvidos pelas espécies receptoras (TREZZI et al., 2016). O conhecimento dos compostos presentes no solo de área contaminada por uma planta invasora, como o capim-annoni-2 pode ser importante para entender sua agressividade como espécie invasora.

Os objetivos deste estudo foram: a) identificar compostos fenólicos presentes no perfil do solo de uma área infestada com capim-annoni-2; b) quantificar os compostos fenólicos presentes no perfil do solo de uma área contaminada; c) determinar a distribuição espacial dos diferentes compostos no perfil do solo.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Amostragem de solo, preparação e extração de compostos fenólicos

No mês de abril do ano de 2015 foram coletadas amostras de solo em área localizada no município de Abelardo Luz (SC). As amostras de solo, em três repetições, foram obtidas em uma área contaminada com capim-annoni-2 e em uma área adjacente livre de capim-annoni-2 e cultivada com culturas anuais (coberta com resteva de milho no dia de amostragem). As amostras de solo foram compostas por nove subamostras (amostragem estratificada), a fim de determinar a distribuição espacial dos compostos alelopáticos no solo da área contaminada, a partir de uma touceira de capim-annoni-2 (Figura 7.1).



Figura 7.1 – Exemplificação da amostragem estratificada de solo para determinação de fitotoxicidade da solução do solo e quantificação espacial de compostos fenólicos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.

As amostras de solo foram coletadas com auxílio de pá de corte em camada de 0 a 15 cm de profundidade, 15 cm de largura e 5 cm de espessura. Cada uma das 9 subamostras foi constituída por um cubo com 5 cm de lado, as quais foram acondicionadas em caixas de isopor para transporte até o laboratório. No laboratório as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos para armazenagem em freezer (-26 °C), até o momento do seu preparo para extração da solução do solo.

O solo foi seco em estufa com circulação forçada de ar modelo 400 marca Ethiktechnology a 40 °C até atingir massa constante. Posteriormente, as amostras de solo foram destorroadas utilizando gral e pistilo de cerâmica e passadas em peneira de solo de aço inox com diâmetro de malha de 2 mm. As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro com tampa e armazenados em ambiente seco e sem luminosidade até o momento da extração da solução do solo.

Para a extração da solução do solo, 50 g de cada subamostra de solo foi pesada, utilizando balança modelo AUY220 marca Shimadzu®, misturada a 150 mL de álcool metílico PA, agitada por 48 horas a 25 °C, em agitador orbital incubadora (tipo *shaker*) modelo Star FT 38 marca Fortinox a 200 rpm e posteriormente centrifugada a 1.200 g por 15 minutos e 25 °C em centrífuga modelo 3-16KL marca Sigma®. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro com poros de 25 µm em funil e posteriormente o solvente foi evaporado utilizando evaporador rotativo modelo BT351

marca Biotech a 40 °C e vácuo, com o resíduo sendo dissolvido em 2 mL de álcool metílico grau espectroscópico para HPLC.

7.2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos

As amostras foram filtradas em filtro de membrana modelo PES 2204525 600C marca Analítica com poros de 0,45 µm para posterior injeção de volume de 20 µL de cada amostra no cromatógrafo líquido, modelo 920-R6 marca Varian®, equipado com coluna ACE® C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm), conforme metodologia proposta por Silva (2016). Os padrões marca Sigma-Aldrich®, com pureza igual ou superior a 99,9 %, foram injetados em misturas no cromatógrafo líquido: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido salicílico, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, resveratrol e quercetina. Como fase móvel foi utilizado gradiente (Tabela 7.1), composto por duas misturas de solventes: A) água e ácido acético (98:2) e B) água, ácido acético e acetonitrila (58:2:40). O sistema foi mantido a 30 °C com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

Tabela 7.1 – Gradiente de concentração de solventes da fase móvel utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da mistura B (água, ácido acético e acetonitrila - 58:2:40) em relação a A (água e ácido acético - 98:2) no tempo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Tempo [min] | Concentração B [%] |
|----------------|-----------------------|
| 0,1 | 5 |
| 2 | 20 |
| 15 | 25 |
| 25 | 85 |
| 30 | 85 |
| 32 | 95 |
| 33 | 95 |
| 36 | 5 |
| 45 | 5 |

Os tempos de retenção dos compostos padrões foram registrados, sendo utilizados como referência para serem comparados com os picos obtidos nos cromatogramas dos extratos. Suas concentrações foram calculadas por interpolação das áreas dos picos dos cromatogramas com as curvas dos padrões. Os coeficientes de determinação (R^2) das equações de regressão linear dos padrões foram maiores

que 0,99 para catequina e epicatequina, 0,96 para ácido cumárico e 0,94 para ácido ferúlico.

7.2.3 Análise estatística

O experimento foi conduzido com três repetições. Os dados das variáveis catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors, com posterior teste de hipótese de Kruskal-Wallis e comparação de médias dois a dois pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), utilizando o software Genes (CRUZ, 2013). As médias das variáveis também foram ajustadas por análise de regressão linear múltipla para ajuste dos mapas de calor.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de solução do solo foram identificados os compostos fenólicos catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico (Figura 7.2). Todos eles já haviam sido identificados em extratos dos tecidos de capim-annoni-2 em trabalhos anteriores, sendo que catequina e epicatequina foram identificados apenas nas folhas enquanto os ácidos cumárico e ferúlico foram identificados tanto nas folhas quanto no sistema radicular (FAVARETTO et al., 2015a).

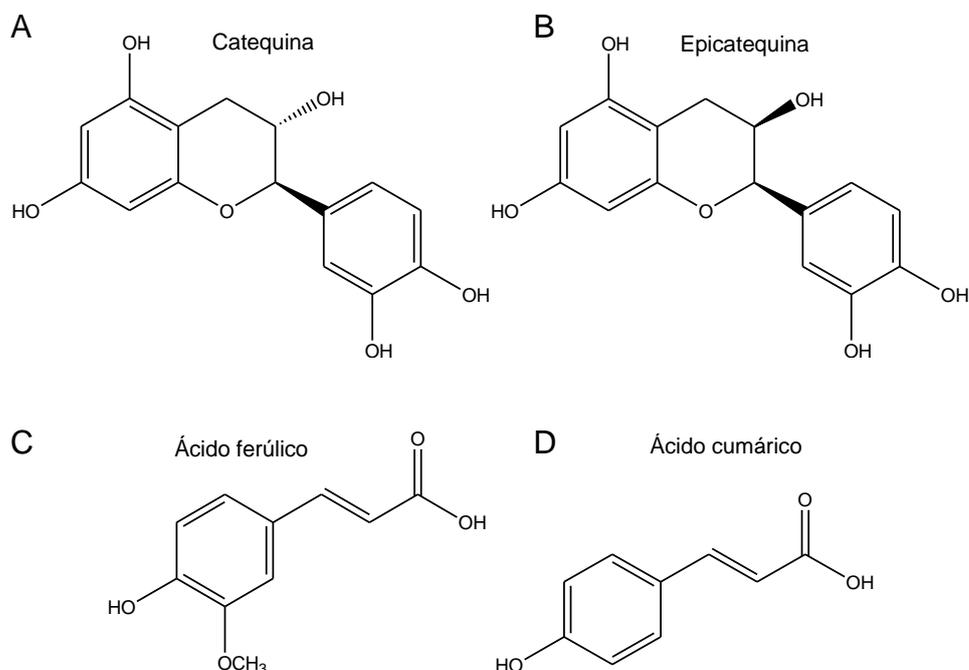


Figura 7.2 – Estruturas bidimensionais de compostos fenólicos (A - Catequina; B - Epicatequina; C - Ácido cumárico, e; D - Ácido ferúlico) identificados na solução do solo de área contaminada por capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Todos os quatro compostos fenólicos foram identificados tanto no solo da área infestada quanto na área livre de capim-annoni-2, mas suas frequências relativas e concentrações diferiram. A frequência relativa da presença dos compostos fenólicos catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico observada nas amostras de solução do solo da área infestada foi muito superior à da área não infestada, para todos os quatro compostos (Tabela 7.2).

Tabela 7.2. Frequência relativa dos compostos fenólicos (%) catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico na solução do solo de área infestada com capim-annoni-2 e em área não infestada (testemunha). Os valores correspondem a média. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| | Catequina | Epicatequina | Ác. Cumárico | Ác. Ferúlico |
|--------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|
| | [%] | | | |
| Área infestada | 85 | 100 | 44 | 96 |
| Área não infestada | 11 | 33 | 33 | 11 |

A frequência relativa indica o percentual de amostras de solo em que foi encontrado determinado aleloquímico, em relação ao total de amostras. As maiores frequências relativas na área infestada foram de epicatequina, catequina e ácido

ferúlico. Na área não infestada as maiores frequências foram da epicatequina e do ácido cumárico, com valores 67 e 11 % inferiores ao da área infestada, respectivamente. É importante destacar que epicatequina apresentou a maior frequência relativa no solo infestado com o capim-annoni-2, estando presente em todas as amostras coletadas, enquanto foi encontrada em apenas 33% das amostras de solo não infestado.

Somado à elevada frequência relativa dos compostos fenólicos catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico na área infestada com capim-annoni-2, as amostras da área infestada também apresentaram maiores concentrações destes compostos do que as amostras da área não infestada. Foi identificada diferença significativa entre os tratamentos para as quatro concentrações de compostos fenólicos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) (Tabela 7.3).

Tabela 7.3. Concentrações dos compostos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo) catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico nos extratos da solução do solo em diferentes posições no perfil de área infestada com capim-annoni-2 e em área não infestada (testemunha). Os valores correspondem a média \pm erro padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

| Faixa de distância em relação ao eixo central da planta [cm] | | Concentrações [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo] | | | |
|--|----------|--|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Horizontal | Vertical | Catequina | Epicatequina | Ác. Cumárico | Ác. Ferúlico |
| 0-5 | 0-5 | 0,106 \pm 0,027 a | 0,505 \pm 0,015 a | 0,016 \pm 0,007 a | 0,017 \pm 0,002 a |
| 5-10 | 0-5 | 0,093 \pm 0,013 a | 0,475 \pm 0,054 abc | 0,012 \pm 0,004 a | 0,015 \pm 0,004 a |
| 10-15 | 0-5 | 0,119 \pm 0,040 ab | 0,594 \pm 0,107 abc | 0,016 \pm 0,004 a | 0,022 \pm 0,004 a |
| 0-5 | 5-10 | 0,080 \pm 0,023 ab | 0,312 \pm 0,026 b | 0,006 \pm 0,006 ab | 0,010 \pm 0,002 a |
| 5-10 | 5-10 | 0,040 \pm 0,000 b | 0,282 \pm 0,054 bc | 0,000 \pm 0,000 b | 0,010 \pm 0,002 a |
| 10-15 | 5-10 | 0,027 \pm 0,013 bc | 0,312 \pm 0,026 b | 0,000 \pm 0,000 b | 0,010 \pm 0,002 a |
| 0-5 | 10-15 | 0,040 \pm 0,023 abc | 0,178 \pm 0,000 c | 0,008 \pm 0,004 ab | 0,007 \pm 0,000 a |
| 5-10 | 10-15 | 0,040 \pm 0,023 abc | 0,193 \pm 0,015 c | 0,000 \pm 0,000 b | 0,005 \pm 0,002 ab |
| 10-15 | 10-15 | 0,040 \pm 0,023 abc | 0,193 \pm 0,015 c | 0,000 \pm 0,000 b | 0,007 \pm 0,000 a |
| Testemunha | 0-5 | 0,000 \pm 0,000 c | 0,089 \pm 0,051 cd | 0,010 \pm 0,005 ab | 0,005 \pm 0,005 ab |
| Testemunha | 5-10 | 0,000 \pm 0,000 c | 0,000 \pm 0,000 d | 0,002 \pm 0,002 ab | 0,000 \pm 0,000 b |
| Testemunha | 10-15 | 0,013 \pm 0,013 bc | 0,000 \pm 0,000 d | 0,000 \pm 0,000 b | 0,000 \pm 0,000 b |

Compostos fenólicos com médias \pm erro padrão não seguidas por mesma letra nas colunas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A análise da distribuição espacial de cada um dos compostos fenólicos a partir de indivíduos de capim-annoni-2 no perfil do solo da área infestada é descrita na Tabela 7.3 e Figura 7.4. Percebe-se a ocorrência de gradiente de concentração, indicando que tanto a ocorrência quanto a concentração destes fenólicos são influenciados pela presença do capim-annoni-2. Detectou-se maior concentração de

todos os compostos na área próxima à superfície do solo e próximo ao eixo central da planta de capim-annoni-2.

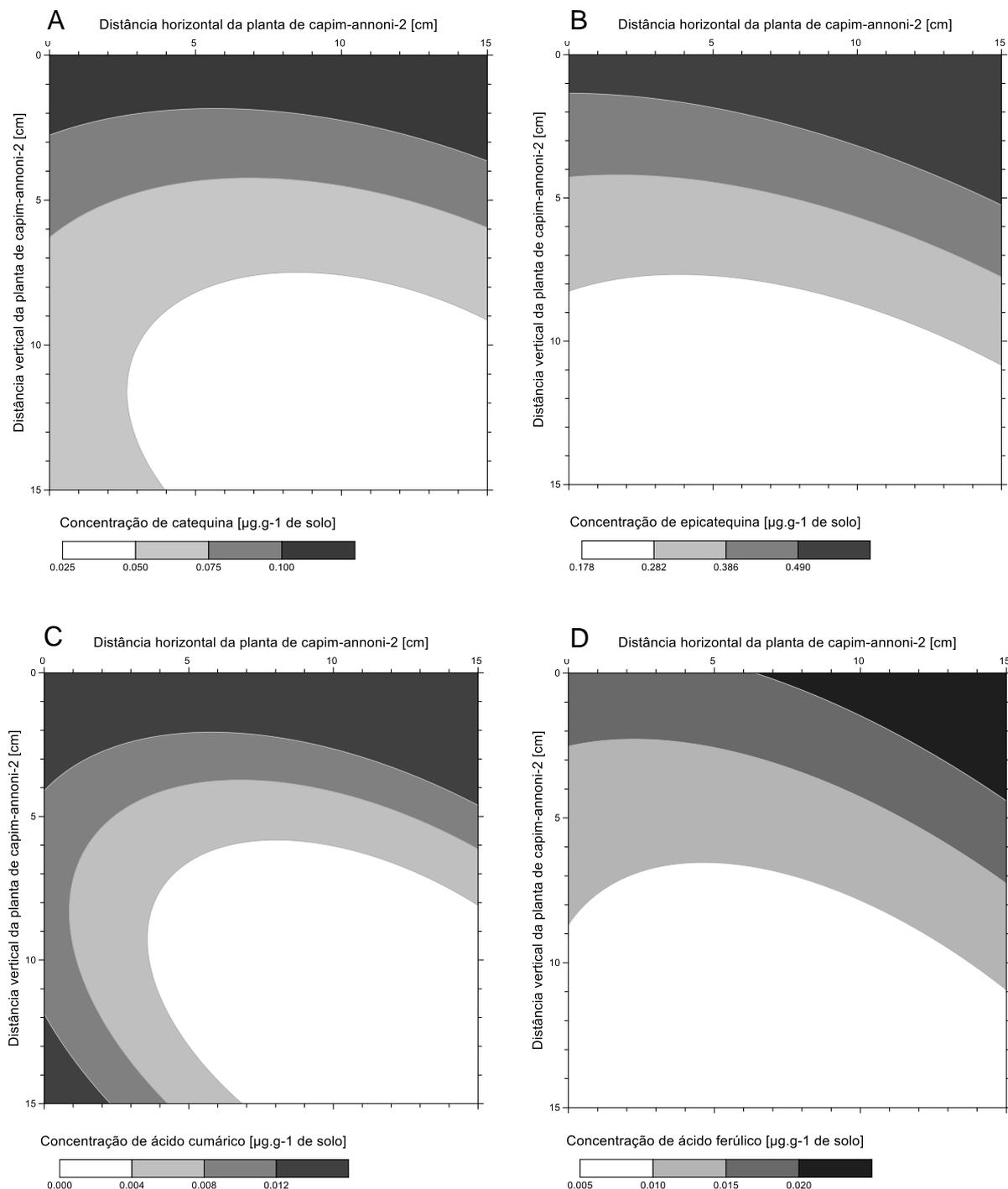


Figura 7.3 – Distribuição espacial no perfil do solo à partir da planta de capim-annoni-2 (cm) da concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) A – Catequina ($R^2 = 61\%$); B – Epicatequina ($R^2 = 86\%$); C - Ácido cumárico ($R^2 = 54\%$), e; D - Ácido ferúlico ($R^2 = 80\%$). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

A maior concentração de catequina na superfície do solo corrobora observações anteriores quando se verificou estabilidade da concentração de catequina em soluções expostas à luz (BLAIR et al., 2005). Esta maior concentração de compostos alelopáticos na superfície do solo, em posição mais afastada das plantas de capim-annoni-2, observado principalmente para epicatequina e ácido ferúlico, pode estar relacionada à sua liberação junto à fitomassa aérea em processo de decomposição. Este resultado talvez explique a ausência de cobertura vegetal próximo às plantas de capim-annoni-2 e também a distância observada entre as touceiras de capim-annoni nas áreas contaminadas, de aproximadamente 0,5 a 1,0 m.

As maiores concentrações de epicatequina encontradas na solução do solo, na superfície e no lado oposto a planta, chegaram a $0,59 \mu\text{g.g}^{-1}$ de solo. Os resultados de trabalho de Inderjit et al. (2008) para determinação de fitotoxicidade de catequina em solo demonstraram fitotoxicidade desta substância em concentrações abaixo de $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de solo. Ainda, em virtude da catequina ter resultado em maiores níveis de fitotoxicidade quando presente no solo do que em ensaios *in vitro*, pode-se teorizar que ela possa aparecer no solo em forma de complexo quelato com íons (INDERJIT et al., 2008). Com isso, é possível que os resultados possam ser justificados pela interação da catequina com os íon ferro (Fe^{2+}) presentes no solo, fazendo com que o complexo formado apresente propriedade pró-oxidativa (KUMAMOTO et al., 2001; SUGIHARA et al., 2001). Esta hipótese, no entanto, deverá ser testada em futuros trabalhos.

Além das maiores concentrações na superfície do solo, os ácidos cumárico e ferúlico também apresentaram concentrações baixas próximo ao sistema radicular do capim-annoni-2. Isto pode indicar maior proporção liberada no processo de decomposição da palha ou maior atividade de microrganismos responsáveis por sua degradação, próximo ao sistema radicular.

Isto indica que estas substâncias possam ser liberadas pelo sistema radicular, além da parte aérea das plantas, algo já observado em *Avena fatua* (IANNUCCI et al., 2013). Em trabalhos anteriores com extratos de capim-annoni foi demonstrado que o ácido cumárico é um dos aleloquímicos detectados no tecido do sistema radicular (FAVARETTO et al., 2015a). Em bioensaio com aplicação de apenas $0,04 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de ácido cumárico no solo, a corda-de-viola teve redução de 10 % na

sua fitomassa seca (BLUM, 1996). Ácido cumárico e ferúlico já foram detectados na rizosfera de aveia-louca (*Avena fatua*), apresentando coeficiente de correlação entre si de 0,74 e em concentrações máximas de 0,00035 e 0,000031 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo, respectivamente, correspondendo a valores 45 e 709 vezes inferiores às concentrações máximas presentes no solo contaminado com capim-annoni-2 (IANNUCCI et al., 2013).

Em trabalho simulando a degradação dos tecidos de milho e centeio, Chou e Patrick (1976) identificaram ácido cumárico e ferúlico na solução do solo, entre outros compostos fenólicos, após período de 30 dias de degradação. Ácido cumárico e ferúlico apresentaram fitotoxicidade em plântulas de alface em concentrações entre 25 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentrações superiores as encontradas na solução do solo contaminado com capim-annoni-2.

Apesar de encontrarem-se em concentrações diferentes dos trabalhos consultados, os compostos fenólicos presentes no solo contaminado com capim-annoni-2 estão entre as substâncias que podem apresentar fitotoxicidade variável, dependendo das condições do ambiente onde encontram-se disponíveis para serem absorvidas pelas plantas alvo. As condições do ambiente podem dizer respeito às condições de temperatura, umidade até a disponibilidade de íons e também de outros compostos que podem conferir características de aditividade e sinergismo quando absorvidas conjuntamente pelas plantas alvo.

Acredita-se que os flavonóides catequina e epicatequina atuem sobre o funcionamento da mitocôndria (EINHELLIG, 2004). Eles ocasionam fitotoxicidade em plantas, principalmente, por inibirem a rota de síntese do ATP e em elevadas concentrações também inibirem o transporte de elétrons (MORELAND; NOVITZKY, 1987). Em outro trabalho, Bais et al. (2003) atribuem à catequina a iniciação de reações a partir de espécies reativas de oxigênio no meristema radicular de plântulas de *Arabidopsis thaliana*, ocasionando modificações na expressão de genes e culminando com a morte do sistema radicular. Apesar das consagradas propriedades antioxidativas da catequina, a presença de íons Ferro (Fe^{2+}) inverte esta característica, fazendo com que ela apresente atividades pró-oxidativas (KUMAMOTO et al., 2001; SUGIHARA et al., 2001).

Catequina e epicatequina isolados de folha, caule e inflorescência de trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum*) apresentaram fitotoxicidade em plântulas de

alface, reduzindo o desenvolvimento radicular em mais de 50 % quando comparado à testemunha (GOLISZ et al., 2007). As concentrações de catequina e epicatequina na parte aérea de trigo mourisco foram de 0,22 e 0,98 mg.g⁻¹ de matéria seca, respectivamente (GOLISZ et al., 2007). Estes valores são muito inferiores àqueles detectados nas folhas de capim-annoni-2 por Favaretto et al. (2015a), cujas concentrações de 4,22 e 9,56 mg.g⁻¹ de matéria seca para epicatequina e catequina, respectivamente, correspondem a valores 4 e 43 vezes superiores aqueles detectados no trigo mourisco com potencial alelopático.

A concentração de epicatequina determinada por Favaretto et al. (2015a) foi 4,22 mg.g⁻¹ (4.220 mg por kg) de fitomassa seca. Supondo que o capim-annoni-2 produza 31.300 kg ha⁻¹ de fitomassa seca por ano (GOULART et al., 2009), produzirá 132.086.000 mg. Como são cerca de 2.400.000 kg de solo em 1 ha, isso significa uma concentração potencial de aproximadamente 55,04 µg g⁻¹ de solo, considerando que toda a fitomassa produzida estivesse sendo degradada e o aleloquímico liberado num determinado momento, e ainda supondo a ausência de perdas. O máximo constatado na solução da área infestada foi de 0,5 µg g⁻¹ de solo, ou seja, aproximadamente 100 vezes menor.

Os ácidos cumárico e ferúlico podem ocasionar modificações no balanço hídrico da planta receptora, culminando com a expressão de sintomas de estresse hídrico em plântulas (EINHELLIG, 2004). Outro modo de ação destes ácidos fenólicos ocorre sobre a fotossíntese, onde reduzem a eficiência do fotossistema II, influenciando a condutividade elétrica e o conteúdo de clorofila, entre outros processos (EINHELLIG, 2004). O ácido ferúlico também aumentou a atividade das enzimas peroxidase, catalase e ácido indolacético oxidase em plântulas de milho (DEVI; PRASAD, 1992) e interferiu no fluxo de carbono em cultura celular, limitando a incorporação do carbono em proteínas (DANKS; FLETCHER; RICE, 1975).

Os sintomas observados pela presença de ácido ferúlico em solução são a diminuição do tamanho das folhas, do comprimento das raízes e da translocação de compostos fotosintetizados, da parte aérea para as raízes (BLUM; REBBECK, 1989). Blum e Rebbeck (1989) também reportaram relação inversamente proporcional entre a concentração de ácido ferúlico e a absorção de fósforo, potássio e água.

7.4 CONCLUSÕES

Foram identificados os compostos fenólicos ácido cumárico, ácido ferúlico, catequina e epicatequina nos extratos da solução do solo da área infestada com capim-annoni-2.

Solos de áreas infestadas com capim-annoni-2 apresentam maior frequência relativa e concentração de compostos fenólicos com potencial alelopático do que solos de área adjacente mantida livre da espécie.

A distribuição dos compostos fenólicos detectados no solo ocorreu em gradientes, tanto no sentido horizontal quanto vertical, a partir do eixo central das plantas doadoras.

As maiores concentrações foram identificadas na superfície do solo, para praticamente todos os compostos. Maior concentração horizontal na extremidade oposta ao eixo principal da planta doadora foi detectada principalmente para os compostos epicatequina e ácido ferúlico, indicando que a sua liberação no ambiente ocorre principalmente a partir da degradação de tecido da parte aérea.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bioensaio avaliando os efeitos ambientais sobre a germinação e a emergência de plântulas de capim-annoni-2 demonstrou que a faixa de temperatura que garante germinação apreciável é relativamente ampla. A germinação ocorre entre 15 e 40 °C, sendo que sob regime de alternância de temperatura 35/20 °C atinge 98 %. Isoladamente, esta característica adaptativa pode ser considerada preocupante para o manejo da espécie pois, adicionada à alta capacidade de produção de sementes por planta, garante fluxos de germinação em diferentes épocas do ano de sementes com alta viabilidade.

Na condição ótima de temperatura (35/20 °C), o processo de germinação ocorre rapidamente, com todas as sementes germinadas completando o processo em um período inferior a cinco dias. A temperatura do ambiente em ocorre a germinação pode ser influenciada por técnicas como o uso de culturas de cobertura, que diminuem a temperatura e a oscilação da temperatura entre o dia e a noite. Além disso, a ocorrência de grandes oscilações na temperatura pode ser monitorada a fim de determinar os períodos de maior fluxo de germinação visando o controle das plantas em estágio inicial de desenvolvimento.

A exposição das sementes a luz ocasionou um aumento de 11% na germinação. Esta característica pode ser explorada por técnicas de manejo que diminuam a exposição do banco de sementes à luz, como uso de culturas de cobertura do solo ou evitando técnicas de revolvimento do solo que transportam sementes de locais profundos até sua superfície. Também pode ser possível utilizar a técnica conhecida como falsa semeadura, onde é realizado primeiramente o preparo superficial do solo para estimular a germinação do número máximo de sementes e posteriormente um preparo profundo do solo visando o controle das plantas.

O potencial hídrico influenciou a capacidade de germinação. Enquanto na ausência de restrição hídrica (0 MPa) a germinação foi de 98 %, a -1,2 MPa foi de 0 %. No entanto, as sementes não germinadas e recuperadas dos tratamentos entre -0,4 e -1,2 MPa, apresentaram germinação superior a 87 % após ressemeadura sob adequada condição hídrica, indicando resistência das sementes à diminuição na disponibilidade de água durante o processo germinativo. Esta é uma característica importante para plantas invasoras, pois permite que as sementes resistam a

condições de estresse hídrico durante o processo germinativo, dando origem a plântulas quando a condição de restrição hídrica é removida.

O capim-annoni apresenta tolerância à salinidade, com a germinação permanecendo maior que 90 % até concentrações de 120 mM de NaCl. Por isso, são esperadas infestações em áreas utilizadas pela agricultura que receberam altas concentrações de adubos solúveis ou que apresentam presença de outros sais de ocorrência natural. No entanto, apesar das sementes germinarem até altos níveis de NaCl, a ocorrência de plântulas normais foi reduzida em 50 % por uma concentração de apenas 69 mM. Esta última característica poderia explicar, em parte, o sucesso do manejo do capim-annoni-2 baseado na modificação do uso das áreas infestadas, passando de pastagens para cultivos anuais, que demandam maior quantidade e frequência de adubação.

A emergência das plântulas de capim-annoni-2 foi maior (87 %) quando as sementes foram depositadas na superfície do solo (0 cm). A emergência decresceu progressivamente com o aumento na profundidade de enterrio das sementes, apresentando redução de 50 % da emergência máxima a 2 cm. Não foi observada emergência de plântulas na profundidade de 4 cm. A dificuldade de emergência em profundidades superiores a 3 cm pode ser ocasionada pela redução na temperatura ou na flutuação da temperatura, pela limitada reserva de nutrientes das sementes de pequeno tamanho e pela sensibilidade das sementes à luz. Por estas razões, é possível que o revolvimento do solo por meio de aração invertida (aivecas) possa auxiliar no manejo da espécie, através do enterrio das sementes em profundidades nas quais as plântulas não conseguirão emergir.

Nos bioensaios avaliando a fitotoxicidade dos extratos brutos sobre o desenvolvimento de plântulas foi verificada fitotoxicidade maior das frações com polaridade média e alta. O extrato bruto acetato de etila foi aquele que resultou nas maiores reduções do comprimento de plântulas de alfafa e trigo, seguido em ordem decrescente de fitotoxicidade pelo extrato metanólico, hexânico e aquoso.

Os extratos acetato de etila e metanólico apresentaram altos níveis de fitotoxicidade, reduzindo o desenvolvimento de plântulas de alfafa e trigo. O extrato hexânico apresentou média fitotoxicidade, reduzindo o desenvolvimento de plântulas de trigo e baixa fitotoxicidade sobre o desenvolvimento de plântulas de alfafa. Já o extrato aquoso apresentou comportamento inverso ao extrato hexânico, com média

fitotoxicidade no desenvolvimento de plântulas de alfafa e baixa fitotoxicidade para trigo. Embora ocorram respostas diferenciadas dependendo da espécie alvo, os extratos de capim-annoni-2 tiveram efeito fitotóxico tanto em espécies anuais como perenes e tanto em mono quanto em dicotiledôneas.

No total, foram identificados nove compostos fenólicos com potencial aleloquímico nas frações obtidas através do processo de extração exaustiva. Nenhum deles foi identificado no extrato bruto hexânico. Ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, catequina e epicatequina foram identificados no extrato bruto acetato de etila. Ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina e rutina no extrato bruto metanólico. Por fim, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina e resveratrol no extrato bruto aquoso.

Os ácidos gálico e vanílico estavam presentes em maiores concentrações no extrato bruto acetato de etila, enquanto o ácido caféico, catequina, epicatequina e rutina apresentaram maiores concentrações no extrato metanólico. Já os ácidos cumárico e ferúlico e o resveratrol estavam presentes em maiores quantidades no extrato aquoso.

Nos bioensaios de fitotoxicidade, a concentração de ácido vanílico demonstrou estar associada à redução do desenvolvimento de plântulas de trigo. Foi determinada correlação de média intensidade e inversamente proporcional entre a concentração de ácido vanílico dos extratos brutos e o comprimento de radícula de plântulas de trigo. Isto demonstra que o ácido vanílico, presente em maior quantidade no extrato bruto acetato de etila, é um potencial aleloquímico envolvido na redução do desenvolvimento radicular de plântulas alvo.

Além da influência dos aleloquímicos presentes na parte aérea do capim-annoni-2, a fitomassa degradada demonstrou fitotoxicidade sobre o desenvolvimento de plântulas alvo. Os bioensaios simulando a degradação da fitomassa comprovaram que o período de incubação por 10 dias influenciou a germinação e o desenvolvimento de plântulas de alfafa, braquiária brizanta e trigo. A alfafa demonstrou sensibilidade ao extrato da fitomassa de capim-annoni-2 incubada, com redução no processo germinativo e no desenvolvimento de plântulas. A germinação de braquiária brizanta respondeu positivamente ao extrato aquoso da fitomassa degradada por 10 dias, enquanto o desenvolvimento das plântulas foi prejudicado. O processo de germinação

de trigo não foi influenciado pelo extrato aquoso, mas o desenvolvimento das plântulas foi diminuído. Enquanto que o efeito sobre a germinação implica em redução de estande, a redução do desenvolvimento inicial de radícula e hipocótilo pode implicar em redução do estande e em perda de capacidade competitiva ou existência de desuniformidade das plantas cultivadas.

A condutividade elétrica é um indicador importante da presença de fitomassa nos extratos aquosos dos materiais incubados. A condutividade elétrica foi a única variável físico-química dos extratos aquosos que apresentou correlação, inversamente proporcional, com a variável comprimento de radícula das plântulas de trigo. Os períodos de incubação em que foram registrados as maiores fitotoxicidades nos bioensaios de desenvolvimento de plântulas de trigo, especialmente sobre o comprimento de radícula, também foram aqueles que registraram os maiores valores de condutividade elétrica. Isto pode indicar que o processo de degradação da fitomassa de capim-annoni-2 não apenas libera aleloquímicos como pode ocasionar aumento na concentração de íons na solução, aumentando a fitotoxicidade dos extratos.

Além da degradação influenciar a fitotoxicidade dos extratos da fitomassa de capim-annoni-2, com os resultados dos bioensaios simulando a degradação da fitomassa misturada ao solo ficou evidenciado aumento na fitotoxicidade dos extratos. A fitotoxicidade do extrato da fitomassa + solo sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo foi maior do que a fitotoxicidade do extrato da fitomassa sozinha, apesar do extrato aquoso da fitomassa ter sido aquele que apresentou as maiores concentrações de fenóis totais até o décimo dia de incubação. Isto pode indicar que o solo apresenta contribuição importante na transformação dos aleloquímicos presentes na fitomassa, uma vez que o extrato aquoso do solo degradado não apresentou fitotoxicidade em todos os períodos de incubação avaliados.

A interação entre a fitomassa e o solo durante o período de incubação pode resultar na transformação e, ou, degradação dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário do capim-annoni-2 pois, dos nove compostos fenólicos potenciais aleloquímicos identificados nos extratos de tecidos da parte aérea de capim-annoni-2, apenas quatro deles também foram identificados no solo da área infestada. Catequina, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico foram identificados

em maior frequência e em maior quantidade no solo da área infestada com o capim-annoni-2 do que no solo próximo mantido livre da infestação da espécie. Isto indica a participação do capim-annoni-2 na disponibilização destes compostos ao solo.

Os gradientes de concentração de ácido cumárico, ácido ferúlico, catequina e epicatequina observados no solo da área infestada sugerem que as concentrações destes aleloquímicos são determinadas pela distância das plantas de capim-annoni-2. As concentrações dos compostos fenólicos variaram conforme a distância vertical e horizontal a partir das plantas, com concentrações mais elevadas próximas ao sistema radicular e, ou, à superfície do solo. Estes resultados podem justificar as observações feitas a campo, onde é possível perceber a ausência de plantas entre os indivíduos de capim-annoni-2 nas áreas invadidas.

Com o conjunto de resultados dos diferentes experimentos conduzidos no presente trabalho se evidencia o envolvimento da alelopatia como interação ecológica potencial em capim-annoni-2, com diferentes compostos alelopáticos sendo produzidos pela planta, liberados pela degradação de tecidos e detectados no solo de área infestada pela espécie. Com isso, o conjunto de resultados atendem os dois requisitos definidos por Inderjit (1996) para comprovação de alelopatia: 1) a demonstração da liberação de potenciais aleloquímicos por tecidos da planta, e; 2) que os compostos apresentam-se no ambiente para interagir com as plantas alvo.

Acredita-se que trabalhos futuros possam simular as interações entre os aleloquímicos identificados nos extratos de capim-annoni-2, tanto em ambiente controlado quanto no solo. Com isso será possível verificar a ocorrência de interação entre os aleloquímicos, estabelecer as quantidades que limitam o desenvolvimento de plântulas ou a germinação de sementes de diferentes plantas alvo e a interação destas substâncias com o solo. Ainda, frações dos extratos brutos da espécie que não foram estudados com profundidade podem ser mapeados na busca de compostos de outras classes químicas que possam apresentar fitotoxicidade, principalmente do extrato bruto acetato de etila. Também pode ser importante identificar e quantificar os compostos que foram registrados, mas que não puderam ser identificados, pela ausência de padrões, nos cromatogramas dos extratos da fitomassa de capim-annoni-2 e nos extratos da solução do solo da área contaminada.

REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, M. R. et al. Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat. **New Phytologist**, v. 150, n. 3, p. 619–627, 2001.
- ABICHEQUER, A. D. et al. Crescimento e distribuição de raízes de capim-annoni-2 e do campo nativo: vantagem competitiva do capim-annoni-2? **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 15, n. 1, p. 7–12, 2009.
- ACHATZ, M.; RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae enhance transport of the allelochemical juglone in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 78, p. 76–82, 2014.
- AHARONI, A. et al. Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants. **The Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 2866–2884, 2003.
- ALMAGHRABI, O. A. Control of wild oat (*Avena fatua*) using some phenolic compounds I – Germination and some growth parameters. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 17–24, 2012.
- ALMEIDA, F. S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: Fundação IAPAR, 1988.
- ALSAADAWI, I. S.; AL-HADITHY, S. M.; ARIF, M. B. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and ions uptake in cowpea seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, n. 1, p. 221–227, 1986.
- AN, M.; PRATLEY, J. E.; HAIG, T. Phytotoxicity of vulpia residues: IV. Dynamics of allelochemicals during decomposition of vulpia residues and their corresponding phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 2, p. 395–409, 2001.
- ANDERSON, W. P. **Weed Science: Principles**. 2nd. ed. Saint Paul: West Publishing CO., 1983.
- APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1521–1552, 1993.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 3, 2005.
- ARBUR, A. **The Gramineae: A Study of Cereal, Bamboo and Grass**. New York: Cambridge University Press, 2010.
- ASLAM, D. N.; HORWATH, W.; VANDERGHEYNST, J. S. Comparison of several maturity indicators for estimating phytotoxicity in compost-amended soil. **Waste Management**, v. 28, n. 11, p. 2070–2076, 2008.
- AVERS, C. J.; GOODWIN, R. H. Studies on Roots. IV. Effects of Coumarin and Scopoletin on the Standard Root Growth Pattern of *Phleum pratense*. **American Journal of Botany**, v. 43, n. 8, p. 612, 1956.
- BAIS, H. P. et al. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1377–1380, 2003.
- BAIS, H. P.; KAUSHIK, S. Catechin secretion & phytotoxicity. **Communicative & Integrative Biology**, v. 3, n. 5, p. 468–470, 2010.
- BAKER, H. Patterns of plant invasion in North America. In: MOONEY, H. A.; DRAKE, J. A. (Eds.). **Ecology of biological invasions of North America and Hawaii**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 44–57.

- BALDWIN, K. R.; CREAMER, N. G. **Cover Crops for Organic Farms**. Raleigh: North Carolina State University / North Carolina Cooperative Extension Service, 2006.
- BARBOSA, F. G. et al. Predicting the current distribution and potential spread of the exotic grass *Eragrostis plana* Nees in South America and identifying a bioclimatic niche shift during invasion. **Austral Ecology**, v. 38, n. 3, p. 260–267, 2013.
- BARKOSKY, R. R.; EINHELLIG, F. A.; BUTLER, J. L. Caffeic Acid-Induced Changes in Plant–Water Relationships and Photosynthesis in Leafy Spurge *Euphorbia esula*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2095–2109, 2000.
- BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2821–2833, 1994.
- BEN-HAMMOUDA, M. L. A.; MONCEF, R. J. K.; MINOR, H. C. Phytotoxicity of extracts from sorghum plant components on wheat seedlings. **Crop Science**, v. 35, n. 6, p. 1652–1656, 1995.
- BITTENCOURT, H. VON H. et al. Seed germination and emergence of *Eragrostis tenuifolia* (A. Rich.) Hochst. ex Steud. in response to environmental factors. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 1, p. 32–38, 2016.
- BLAIR, A. C. et al. New techniques and findings in the study of a candidate allelochemical implicated in invasion success. **Ecology Letters**, v. 8, n. 10, p. 1039–1047, 2005.
- BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. **Journal of Nematology**, v. 28, n. 3, p. 259–67, 1996.
- BLUM, U. Allelopathy: a soil system perspective. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). . **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. 1st. ed. Dordrecht: Springer, 2006. p. 299–340.
- BLUM, U. **Plant-Plant Allelopathic Interactions: Phenolic Acids, Cover Crops and Weed Emergence**. Dordrecht: Springer, 2011.
- BLUM, U.; REBBECK, J. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 3, p. 917–928, 1989.
- BOECHAT, S. C.; VALLS, J. F. M. O gênero *Eragrostis* von Wolf (Gramineae; Chloridoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 34, p. 51–130, 1986.
- BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4126–4133, 14 abr. 1998.
- BOLDRINI, I. I. A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, V. D. P. et al. (Eds.). . **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - Brasil, 2009. p. 63–77.
- BONANOMI, G. et al. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. **The New phytologist**, v. 169, n. 3, p. 571–8, 2006.
- BÖRNER, H. Liberation of organic substances from higher plants and their role in the

- soil sickness problem. **The Botanical Review**, v. 26, n. 3, p. 393–424, 1960.
- BOTHA, C. E. J. Plasmodesmatal distribution, structure and frequency in relation to assimilation in C3 and C4 grasses in southern Africa. **Planta**, v. 187, p. 348–358, 1992.
- BOYD, S. A. Adsorption of substituted phenols by soil. **Soil Science**, v. 136, n. 5, p. 337–343, 1982.
- BRANCO, S. B. et al. Atributos químicos do solo e lixiviação de compostos fenólicos após adição de resíduo sólido alcalino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 543–550, 2013.
- BRASIL. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.
- BRAVO, H. R.; COPAJA, S. V.; LAMBOROT, M. Phytotoxicity of Phenolic Acids From Cereals. In: PRICE, A. J.; KELTON, J. A. (Eds.). **Herbicides: Advances in Research**. Rijeka: InTech, 2013. p. 37–49.
- BRINK, M.; BELAY, G. **Plant resources of tropical Africa 1: Cereals and pulses**. Wageningen: PROTA Foundation, 2006.
- CASTELLS, E. Indirect Effects of Phenolics on Plant Performance by Altering Nitrogen Cycling: Another Mechanism of Plant–Plant Negative Interactions. In: ZENG, R. SEN; MALLIK, A. U.; LUO, S. M. (Eds.). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. New York: Springer Science, 2008. p. 137–158.
- CHEN, L. et al. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1653–1663, 2011.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–16, 2015.
- CHON, S.-U.; KIM, J.-D. Biological Activity and Quantification of Suspected Allelochemicals from Alfalfa Plant Parts. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 188, n. 4, p. 281–285, 2002.
- CHOU, C.-H.; LEU, L.-L. Allelopathic substances and interactions of *Delonix regia* (Boj) Raf. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 12, p. 2285–2303, 1992.
- CHOU, C.-H.; PATRICK, Z. A. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 3, p. 369–387, 1976.
- CLAYTON, W. D. et al. **GrassBase - The Online World Grass Flora**. Disponível em: <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>. Acesso em: 17 maio. 2015.
- COBB, A. H.; READE, J. P. H. **Herbicides and Plant Physiology**. 2nd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2010.
- COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim-annoni-2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 255–263, 1986.
- CRUSCIOL, C. A. C. et al. Persistência de palhada e liberação de nutrientes do nabo forrageiro no plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 161–168, fev. 2005.

- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, 2013.
- CZARNOTA, M. A. et al. Mode of Action, Localization of Production, Chemical Nature, and Activity of Sorgoleone: A Potent PSII Inhibitor in Sorghum spp. Root Exudates 1. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 813–825, 2001.
- CZARNOTA, M. A. et al. Anatomy of Sorgoleone- Secreting Root Hairs of Sorghum Species. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 6, p. 861–866, 2003.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- DALBOSCO, T. **Avaliação do potencial alelopático dos extratos foliares brutos de capim-annoni-2 (Eragrostis plana Nees) e estudo do óleo essencial**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.
- DANKS, M. L.; FLETCHER, J. S.; RICE, E. L. Effects of Phenolic Inhibitors on Growth and Metabolism of Glucose-UI- 14 C in Paul's Scarlet Rose Cell-Suspension Cultures. **American Journal of Botany**, v. 62, n. 3, p. 311, 1975.
- DERAKHSHAN, A. et al. Quantitative Description of the Germination of Littleseed Canarygrass (*Phalaris minor*) in Response to Temperature. **Weed Science**, v. 62, n. 2, p. 250–257, abr. 2014.
- DEVI, S. R.; PRASAD, M. N. V. Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 11, p. 1981–1990, 1992.
- DJURDJEVIC, L. et al. Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 6, p. 533–544, 2004.
- DOUGHARI, J. H. Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. In: RAO, V. (Ed.). . **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Rijeka: InTech, 2012. p. 1–32.
- DUKE, S. O. et al. Is (-)-Catechin a Novel Weapon of Spotted Knapweed (*Centaurea stoebe*)? **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 2, p. 141–153, 2009.
- DUMUR, D.; PILBEAM, C. J.; CRAIGON, J. Use of the Weibull Function to Calculate Cardinal Temperatures in Faba Bean. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 11, p. 1423–1430, 1990.
- EINHELLIG, F. A. Effects of tannic acid on growth and stomatal aperture in tobacco. **Proceedings of the South Dakota Academy of Science**, v. 50, p. 205–209, 1971.
- EINHELLIG, F. A. Interactions Involving Allelopathy in Cropping Systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 886–893, 1996.
- EINHELLIG, F. A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: MACÍAS, F. A. et al. (Eds.). . **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 217–238.
- EINHELLIG, F. A.; ECKRICH, P. C. Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, n. 1, p. 161–170, 1984.
- EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A. Effects of three phenolic acids on chlorophyll

content and growth of soybean and grain sorghum seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, n. 5, p. 815–824, 1979.

EVANGELOU, B. **Environmental soil and water chemistry: principles and applications**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

EVANS, C. E.; ETHERINGTON, J. R. The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. **New Phytologist**, v. 115, n. 3, p. 539–548, 1990.

FAN, P. **Phytochemical and bioactivity investigations of three invasive neophytes *Buddleja davidii* Franch (Buddlejaceae), *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. and *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim (Nakai) (Polygonaceae)**. [s.l.] Université de Genève, 2009.

FANG, C. et al. Changes in Rice Allelopathy and Rhizosphere Microflora by Inhibiting Rice Phenylalanine Ammonia-lyase Gene Expression. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 204–212, 2013.

FAVARETTO, A. et al. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1168–1172, 2011.

FAVARETTO, A. et al. Pattern of allelochemical distribution in leaves and roots of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 11, p. 1119–1125, 2015a.

FAVARETTO, A. et al. The first anatomical and histochemical study of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees, Poaceae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 30, p. 2940–2947, 2015b.

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

FERREIRA, A. T. **Uma “exótica” no Campo: o capimannoni-2 e suas influências na produção agropecuária na coxilha de São Rafael, município de Quaraí - RS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B.; SOARES, G. L. G. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 43–50, 2008.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B. DE; FAVRETO, R. Banco de sementes do solo de margem viária dominada por capim-annoni-2 e sujeito ao controle com distúrbios no solo e introdução de gramíneas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 54–63, 2008.

FIELD, B.; JORDÁN, F.; OSBOURN, A. First encounters - deployment of defence-related natural products by plants. **New Phytologist**, v. 172, n. 2, p. 193–207, 2006.

FIORENZA, M. et al. Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia**, v. 71, n. 2, p. 193–200, 2016.

FOCHT, T.; MEDEIROS, R. B. DE. Prevention of natural grassland invasion by *Eragrostis plana* Nees using ecological management practices. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 8, p. 1816–1823, 2012.

GARCIA, R. et al. Efeito do Potencial Hídrico na Germinação de Sementes de Três

Gramíneas Forrageiras Tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 9–15, 1998.

GHAREIB, H. R. A.; ABDELHAMED, M. S.; IBRAHIM, O. H. Antioxidative effects of the acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. **Weed Biology and Management**, v. 10, n. 1, p. 64–72, mar. 2010.

GIACOMINI, S. J. et al. Liberação de fósforo e potássio durante a decomposição de resíduos culturais em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1097–1104, 2003.

GLASS, A. D. M. Influence of Phenolic Acids on Ion Uptake: I. Inhibition of Phosphate Uptake. **Plant Physiology**, v. 51, n. 6, p. 1037–1041, 1973.

GLASS, A. D. M.; BOHM, B. A. The uptake of simple phenols by barley roots. **Planta**, v. 100, n. 2, p. 93–105, 1971.

GLASS, A. D. M.; DUNLOP, J. Influence of Phenolic Acids on Ion Uptake: IV. Depolarization of Membrane Potentials. **Plant Physiology**, v. 54, n. 6, p. 855–858, 1974.

GOLISZ, A. et al. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. **Weed Biology and Management**, v. 7, n. 3, p. 164–171, 2007.

GOMAA, N. H. et al. Allelopathic effects of *Sonchus oleraceus* L. on the germination and seedling growth of crop and weed species. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 408–416, 2014.

GONZÁLEZ, V. et al. Effectiveness of amendments on the spread and phytotoxicity of contaminants in metal–arsenic polluted soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 205–206, p. 72–80, 2012.

GOULART, I. C. G. R. et al. Controle de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) com herbicidas pré-emergentes em associação com diferentes métodos de manejo do campo nativo. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 181–190, 2009.

GRIME, J. P. et al. A Comparative Study of Germination Characteristics in a Local Flora. **Journal of Ecology**, v. 69, n. 3, p. 1017–1059, 1981.

HANDA, S. S. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA, S. S. et al. (Eds.). **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: United Nations, 2008. p. 21–54.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B.; HELDT, F. **Plant Biochemistry**. 4th. ed. Burlington: Academic Press, 2011.

HIERRO, J. L.; CALLAWAY, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 29–39, 2003.

HOLDSWORTH, M. J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W. J. J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**, v. 179, n. 1, p. 33–54, 2008.

HOLM, L. G. **World Weeds: Natural Histories and Distribution**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

HOSSAIN, D. et al. Suppressive Effects of Coumarins on Pumpkin Seedling Growth and Glutathione S-Transferase Activity. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 187–192, 2008.

- HOWELL, C.; SAWYER, J. W. D. **New Zealand naturalised vascular plant checklist**. Wellington: New Zealand Plant Conservation Network, 2006.
- IANNUCCI, A. et al. Plant growth and phenolic compounds in the rhizosphere soil of wild oat (*Avena fatua* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–7, 2013.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 186–202, 1996.
- INDERJIT et al. Phytotoxic Effects of (\pm)-Catechin In vitro, in Soil, and in the Field. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2536, 2008.
- INDERJIT; NILSEN, E. T. Bioassays and Field Studies for Allelopathy in Terrestrial Plants: Progress and Problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3–4, p. 221–238, 2003.
- INSTITUT FÜR ARBEITSSCHUTZ DER DEUTSCHEN GESETZLICHEN UNFALLVERSICHERUNG. **GESTIS - Substance Database**. Disponível em: <<http://gestis-en.itrust.de/>>. Acesso em: 22 out. 2015.
- IQBAL, Z. et al. Allelopathy of buckwheat: Assessment of allelopathic potential of extract of aerial parts of buckwheat and identification of fagomine and other related alkaloids as allelochemicals. **Weed Biology and Management**, v. 2, n. 2, p. 110–115, 2002.
- JACOBSON, A.; CORCORAN, M. R. Tannins as gibberellin antagonists in the synthesis of alpha-amylase and Acid phosphatase by barley seeds. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 129–33, 1977.
- JANOVICEK, K. J. et al. Early corn seedling growth response to phenolic acids. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n. 3, p. 391–393, 1997.
- JAVAID, M. M.; TANVEER, A. Germination ecology of *Emex spinosa* and *Emex australis*, invasive weeds of winter crops. **Weed Research**, v. 54, n. 6, p. 565–575, dez. 2014.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ª ed. São Bernardo do Campo: BASF, 1999.
- KLEIN, A. P. **Estudo Fitoquímico das Folhas de Capim Annoni-2 (Eragrostis Plana Nees) Coletadas no Inverno e Verão**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
- KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2004.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Allelopathic interactions in agroecosystems. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). . **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. 1st. ed. Dordrecht: Springer, 2006. p. 465–493.
- KUITERS, A. T. Effects of phenolic acids on germination and early growth of herbaceous woodland plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 2, p. 467–479, 1989.
- KUMAMOTO, M. et al. Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 126–132, 2001.

- KUTCHAN, T. M. et al. Natural Products. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONE, R. L. (Eds.). . **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Second ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., 2015. p. 1132–1206.
- LAWLEY, Y. E.; TEASDALE, J. R.; WEIL, R. R. The Mechanism for Weed Suppression by a Forage Radish Cover Crop. **Agronomy Journal**, v. 104, n. 2, p. 205, 2012.
- LI, Z.-H. et al. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8933–8952, 2010.
- LIMA, M. DA G. DE S. et al. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas a estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 54–61, 2005.
- LISBOA, C. A. V. et al. Poder germinativo de sementes de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Ness) recuperadas em fezes de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 405–410, 2009.
- LIU, Y.; LI, F.; HUANG, Q. Allelopathic effects of gallic acid from *Aegiceras corniculatum* on *Cyclotella caspia*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 4, p. 776–784, 2013.
- LÔBO, L. T. et al. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493–497, 2008.
- LÓPEZ, P. J.; JUAN, T. G. **Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin-Ciocalteu**. Valladolid: [s.n.].
- MACEDO, W. **Reunião Regional de Avaliação de Pesquisa com Annoni 2**. Bagé: Embrapa, 1993.
- MACÍAS, F. A. et al. Allelopathy - A natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 327–348, 2007.
- MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176, 1962.
- MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 1992.
- MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 86–96, 2005.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.
- MARSHALL, E. J. P. Weeds and Biodiversity. In: NAYLOR, R. E. L. (Ed.). . **Weed Management Handbook**. 9th. ed. Oxford: Blackwell, 2002. p. 75–92.
- MARTENS, D. A. Relationship Between Plant Phenolic Acids Released during Soil Mineralization and Aggregate Stabilization. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 6, p. 1857, 2002.
- MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. 7th. ed. Belmont: Cengage Learning, 2008.
- MEDEIROS, R. B.; PILLAR, V. D.; REIS, J. C. L. **Expansão de *Eragrostis plana* Ness (capim-annoni-2), no Rio Grande do Sul e indicativos de controle**. Reunión del grupo técnico regional del cono sur en mejoramiento y utilización de los

- recursos forrajeros del área tropical y subtropical. **Anais...**Salto: Universidad de la República, 2004
- MEDEIROS, R. B. DE et al. Seed longevity of *Eragrostis plana* Nees buried in natural grassland soil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 11, p. 561–567, 2014.
- MEDEIROS, R. B. DE; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 13, n. 1–2, p. 105–114, 2007.
- MEDEIROS, R. B. DE; SAIBRO, J. C. DE; FOCHT, T. Invasão de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no bioma Pampa do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, V. D. P. et al. (Eds.). **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - Brasil, 2009. p. 317–330.
- MELO, V. DE F. et al. Caracterização química e mineralógica de agregados de diferentes classes de tamanho de Latossolos Bruno e Vermelho localizados no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 67–83, 2008.
- MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, n. 5, p. 914–916, 1973.
- MOLISCH, H. **The influence of one plant on another: allelopathy**. Jodhpur: Scientific Publishers, 2001.
- MORELAND, D. E.; NOVITZKY, W. P. **Effects of Phenolic Acids, Coumarins, and Flavonoids on Isolated Chloroplasts and Mitochondria**. ACS Symposium Series. **Anais...**1987Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1987-0330.ch023>>
- MORELAND, D. E.; NOVITZKY, W. P. Interference by flavone and flavonols with chloroplast-mediated electron transport and phosphorylation. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3359–3366, 1988.
- MORGAN, P. W.; POWELL, R. D. Involvement of Ethylene in Responses of Etiolated Bean Hypocotyl Hook to Coumarin. **Plant Physiology**, v. 45, n. 5, p. 553–557, 1970.
- MUTHUKUMAR, G.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MAHADEVAN, A. Effect of Tannins on Plants and on their Productivity. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 51, n. 2, p. 270–281, 1985.
- NASCIMENTO, A. DO; HALL, G. A. B. Estudos comparativos de capimannoni 2 (*Eragrostis plana*) e pastagem nativa de várzea da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul: I. Características químico-bromatológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 7–14, 1978.
- NETZLY, D. H.; BUTLER, L. G. Roots of *Sorghum* Exude Hydrophobic Droplets Containing Biologically Active Components1. **Crop Science**, v. 26, n. 4, p. 775, 1986.
- OLIVA, A. et al. Effects of *Ruta graveolens* leaves on soil characteristics and on seed germination and early seedling growth of four crop species. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 1, p. 87–91, 2002.
- PATTERSON, D. T. Effects of Allelopathic Chemicals on Growth and Physiological Responses of Soybean (*Glycine max*) on JSTOR. **Weed Science**, v. 29, n. 1, p. 53–59, 1981.

PENFIELD, S.; HALL, A. A Role for Multiple Circadian Clock Genes in the Response to Signals That Break Seed Dormancy in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 21, n. 6, p. 1722–1732, 2009.

PILLAI, B. V. S.; SWARUP, S. Elucidation of the Flavonoid Catabolism Pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by Comparative Metabolic Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 143–151, 2002.

PIMENTEL, D. Introduction: Nonnative species in the world. In: PIMENTEL, D. (Ed.). **Biological invasions : economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 430.

PIND, A.; FREEMAN, C.; LOCK, M. A. Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands — measurement of phenol oxidase activity. **Plant and Soil**, v. 159, n. 2, p. 227–231, 1994.

PUTNAM, A. R. Weed allelopathy. In: DUKE, S. O. (Ed.). **Weed Physiology, v. 1: reproduction and ecophysiology**. Boca Raton: CRC, 1987. p. 131–155.

QUATTROCCHI, U. **CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants**. Boca Raton: CRC Press, 2012.

RAI, V. K.; SHARMA, S. S.; SHARMA, S. Reversal of ABA-Induced Stomatal Closure by Phenolic Compounds. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 1, p. 129–134, 1986.

RASHID, M. H.; ASAEDA, T.; UDDIN, M. N. The Allelopathic Potential of Kudzu (*Pueraria montana*). **Weed Science**, v. 58, n. 1, p. 47–55, 2010.

RASMUSSEN, J. A.; EINHELLIG, F. A. Inhibitory effects of combinations of three phenolic acids on grain sorghum germination. **Plant Science Letters**, v. 14, n. 1, p. 69–74, 1979.

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.

REIS, J. C. L.; COELHO, R. W. **Controle do capim-annoni-2 em campos naturais e pastagens**. Pelotas: Embrapa, 2000.

RICE, E. L. Chemical nature of inhibitors. In: RICE, E. L. (Ed.). **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1974. p. 245–270.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd. ed. Orlando: Academic Press, 1984.

RIMANDO, A. M. et al. A New Photosystem II Electron Transfer Inhibitor from *Sorghum bicolor*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 927–930, 1998.

ROSS, M. A.; LEMBI, C. A. **Applied Weed Science**. 3rd. ed. Columbus: Pearson, 2008.

RYVES, T. B.; CLEMENT, E. J.; FOSTER, M. C. **Alien Grasses of the British Isles: A Provisional Catalogue**. London: Botanical Society of the British isles, 1996.

SANTOS, S. et al. Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 51–68, 2011.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; CECCHIN, K.; FAVARETTO, A. Dynamic of dominance,

- growth and bromatology of *Eragrostis plana* Nees in secondary vegetation area. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, v. 47, n. 3, p. 582–588, 2016.
- SCHONBECK, M. How Cover Crops Suppress Weeds. **eOrganic**, n. 2535, 2015.
- SEIGLER, D. S. Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. In: **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 11–61.
- SHAO, H. et al. Phytotoxic Effects and a Phytotoxin from the Invasive Plant *Xanthium italicum* Moretti. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 4037–4046, 2012.
- SHINOMURA, T. Phytochrome regulation of seed germination. **Journal of Plant Research**, v. 110, n. 1, p. 151–161, 1997.
- SILVA, M. G. F. **Avaliação do Potencial Alelopático de Raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e Estudo Fitoquímico**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.
- SILVA, A. A. DA; SILVA, J. F. DA. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. 1st. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- SILVA, R. C. O. DA. **Validação de Metodologia Analítica por CLAE-DAD para Determinação de Compostos Fenólicos e Atividade Biológica em Coprodutos Agroindustriais**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 10th. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- SOUZA FILHO, A. P. . P. S.; TREZZI, M. . M.; IOUE, M. . H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 709–716, 2011.
- SOUZA FILHO, A. P.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689–697, 2010.
- SOUZA FILHO, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 357–364, 2002.
- 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.
- STENLID, G. Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. **Phytochemistry**, v. 9, n. 11, p. 2251–2256, 1970.
- SUGIHARA, N. et al. Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes. **Journal of Health Science**, v. 47, n. 2, p. 99–106, 2001.
- SUITS, L. D. et al. Estimation of Osmotic Suction from Electrical Conductivity and Water Content Measurements in Unsaturated Soils. **Geotechnical Testing Journal**, v. 31, n. 2, p. 100322, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5th. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2010.
- THARAYIL, N.; BHOWMIK, P. C.; XING, B. Preferential Sorption of Phenolic

- Phytotoxins To Soil: Implications for Altering the Availability of Allelochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 3033–3040, 2006.
- THELEN, G. C. et al. Insect herbivory stimulates allelopathic exudation by an invasive plant and the suppression of natives. **Ecology Letters**, v. 8, n. 2, p. 209–217, 2005.
- TIMBERLAKE, K. C. **Chemistry: an introduction to general, organic, and biological chemistry**. 12th. ed. Boston: Pearson, 2015.
- TOMASZEWSKI, M.; THIMANN, K. V. Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. **Plant Physiology**, v. 41, n. 9, p. 1443–54, 1966.
- TREZZI, M. M. et al. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture. **Journal of Plant Interactions**, v. 11, n. 1, p. 53–60, 2016.
- TREZZI, M. M.; SILVA, H. L. Alelopatia. In: VIDAL, R. A. (Ed.). **Interação negativa entre plantas: inicialismo, alelopatia e competição**. Porto Alegre: Evangraf, 2010. p. 50–75.
- U.S. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Open Chemistry Database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 23 out. 2015.
- USDA. **Germplasm Resources Information Network - Online Database**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/4/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?15323>>. Acesso em: 22 maio. 2015.
- VALERIA, M.; SANTIAGO, C. C4 Plants Adaptation to High Levels of CO2 and to Drought Environments. In: SHANKER, A. (Ed.). **Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations**. [s.l.] InTech, 2011. p. 415–428.
- VALLS, J. F. M. et al. O patrimônio florístico dos Campos: potencialidades de uso e a conservação de seus recursos genéticos. In: **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - Brasil, 2009. p. 139–154.
- VERLOOVE, F. **Catalogue of neophytes in Belgium (1800-2005)**. Meise: National Botanic Garden of Belgium, 2006.
- VIDAL, R. A. **Amount of crop residues in no-till farming affects weed-crop ecosystems**. [s.l.] Purdue University, 1995.
- VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T. Fate of allelochemicals in the soil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 351–357, 1997.
- VRCHOTOVÁ, N.; ŠERÁ, B.; TRÍSKA, J. The Stilbene and Catechin Content of the Spring Sprouts of Reynoutria Species. **Acta Chromatographica**, n. 19, p. 21–28, 2007.
- WARDLE, D. A. et al. An ecosystem-level perspective of allelopathy. **Biological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 305–319, 1998.
- WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- WEIBULL, W. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics**, v. 8, n. 1, p. 293–297, 1951.

WIERZBICKA, M.; OBIDZIŃSKA, J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. **Plant Science**, v. 137, n. 2, p. 155–171, 1998.

WOJCIK-WOJTKOWIAK, D. et al. Phenolic substances as allelopathic agents arising during the degradation of rye (*Secale cereale*) tissues. **Plant and Soil**, n. 124, p. 143–147, 1990.

WOJNÁROVITS, L.; TAKÁCS, E. Radiation Induced Degradation of Organic Pollutants in Waters and Wastewaters. **Topics in Current Chemistry**, v. 374, n. 4, p. 50, 2016.

WU, H. et al. Screening methods for the evaluation of crop allelopathic potential. **The Botanical Review**, v. 67, n. 3, p. 403–415, 2001.

YANG, X. SOR1, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 406, p. 2251–2259, 2004.

ZEID, M. et al. Eragrostis. In: **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Berlin: Springer, 2011. p. 135–151.

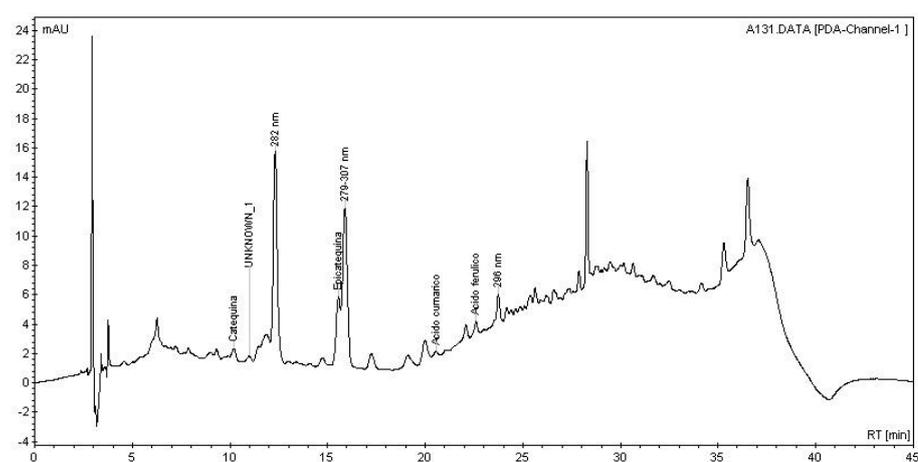
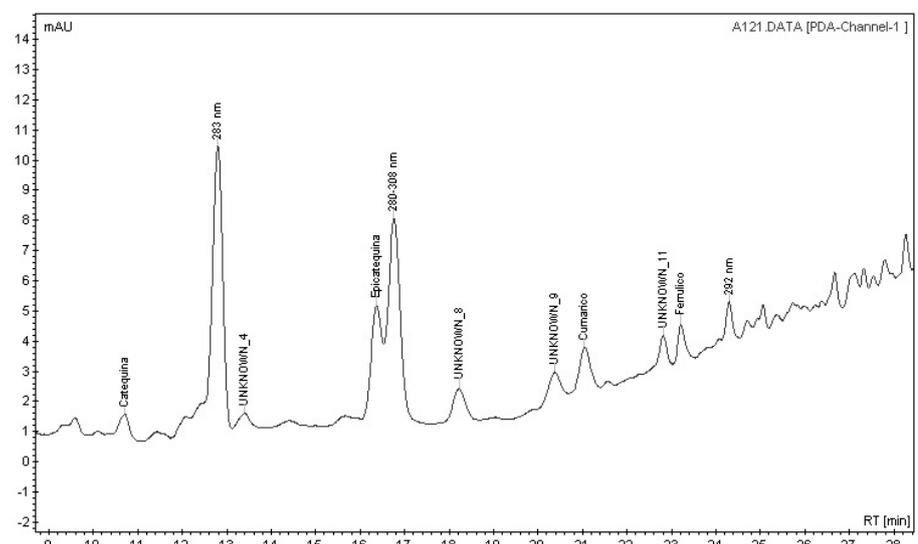
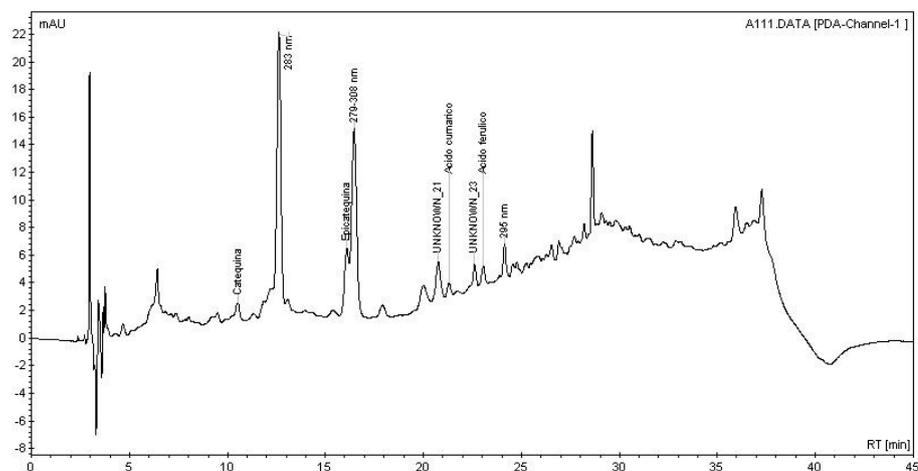
ZENNI, R. D.; ZILLER, S. R. An overview of invasive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 3, p. 431–446, 2011.

VITA

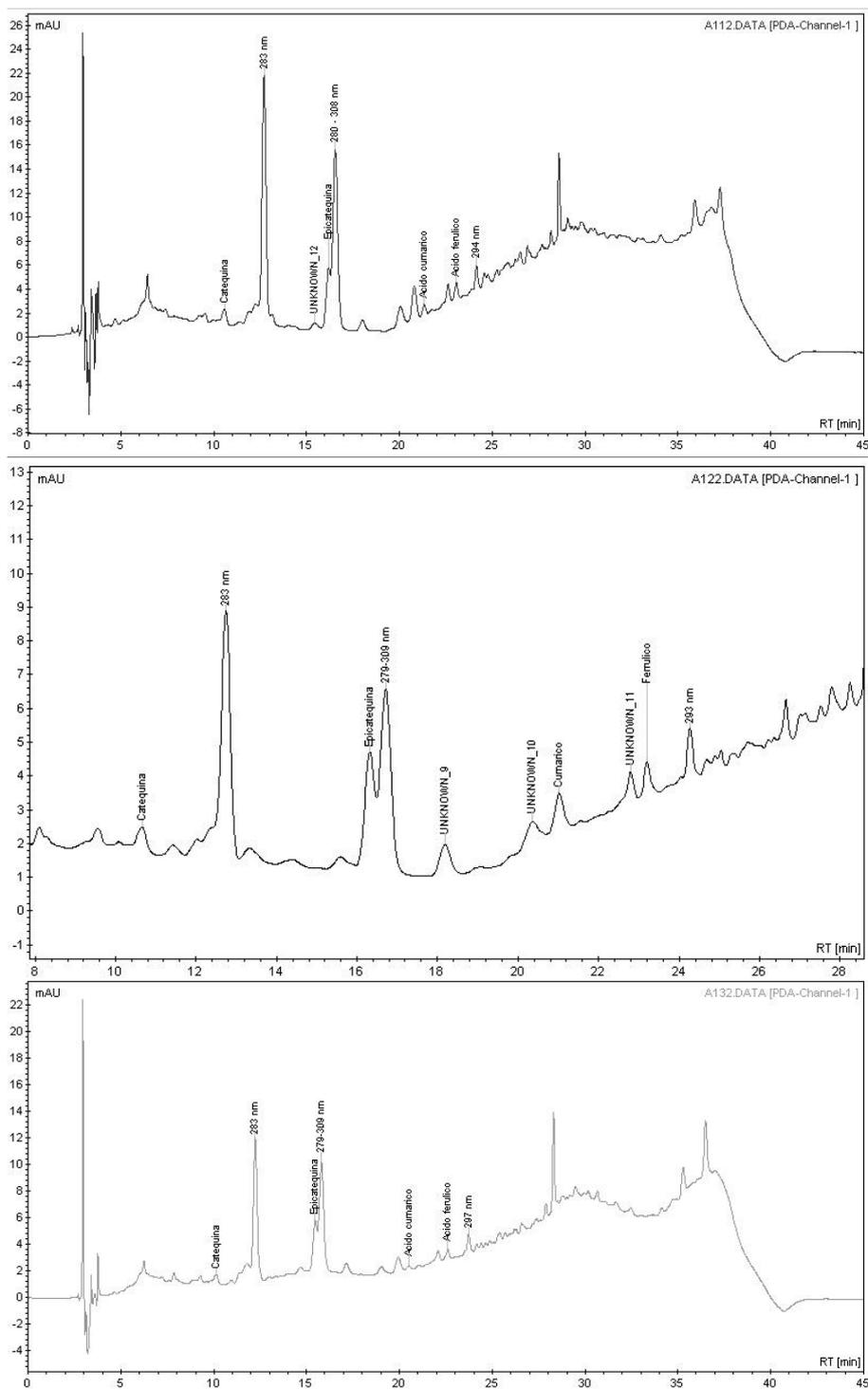
Henrique von Hertwig Bittencourt é filho de Paulo Cesar Trevisol Bittencourt e Monique von Hertwig Bittencourt. Nasceu no município de Abelardo Luz (SC) no dia 18 de abril de 1981. Em 1999 concluiu o ensino médio em Florianópolis (SC). Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Catarina no ano de 1999, e em 2004 foi bolsista de graduação do projeto de intercâmbio Capes-Fipse na *University of California at Berkeley* (EUA) sob supervisão do professor Dr. Miguel Angel Altieri. No ano de 2005 obteve o grau de Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Santa Catarina com o trabalho de conclusão de curso “A matriz energética no desenvolvimento sustentável de pequenas propriedades rurais” sob orientação do professor M.Sc. Antônio Carlos Machado da Rosa. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina em 2006 como bolsista Capes e em 2008 obteve o grau de Mestre em Agroecossistemas com a dissertação “Culturas de cobertura de inverno na implantação de sistema de plantio direto sem uso de herbicidas” sob orientação do professor Dr. Paulo Emílio Lovato. No ano de 2008 atuou como professor substituto da disciplina de Topografia nos cursos de Agronomia, Zootecnia e Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Ainda em 2008 foi aprovado em concurso público para o cargo de Pesquisador da área de Fitotecnia do Instituto Agrônomo do Paraná na Unidade de Pesquisa de Pato Branco, cuja função exerceu até 2011. Em 2011 obteve o grau de Especialista em Controle Biológico pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná com a monografia “Controle biológico de plantas espontâneas em agroecossistemas” sob orientação do professor Dr. Gilmar Franzener. No ano de 2010 foi aprovado em concurso público para o cargo de professor do magistério superior da Universidade Federal da Fronteira Sul *Campus Laranjeiras do Sul* (PR), sendo a função que desempenha desde 2011, lecionando as disciplinas de Ciência das Plantas Espontâneas, Manejo de Plantas Espontâneas, Ecologia Agrícola e Recursos Naturais e Energias Renováveis no curso de graduação em Agronomia. No ano de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, defendendo o título de Doutor em 2017 com a tese “Ecologia da germinação e potencial alelopático de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees)” sob orientação do professor Dr. Michelangelo Muzell Trezzi.

ANEXOS

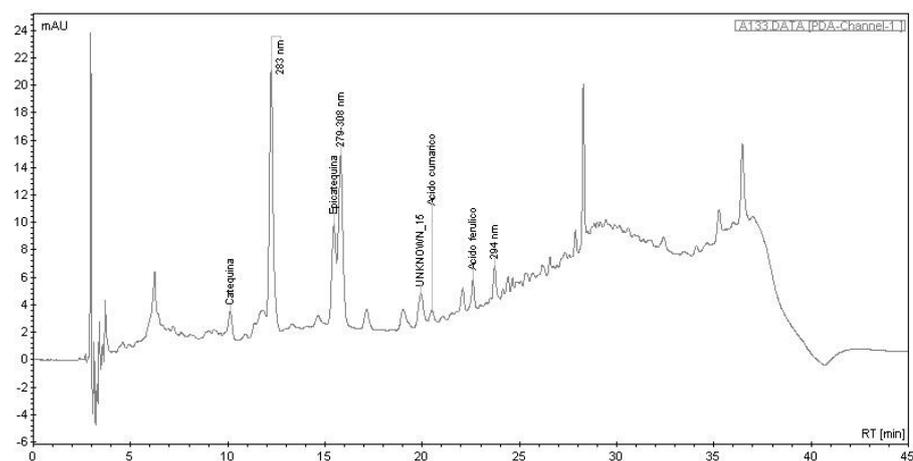
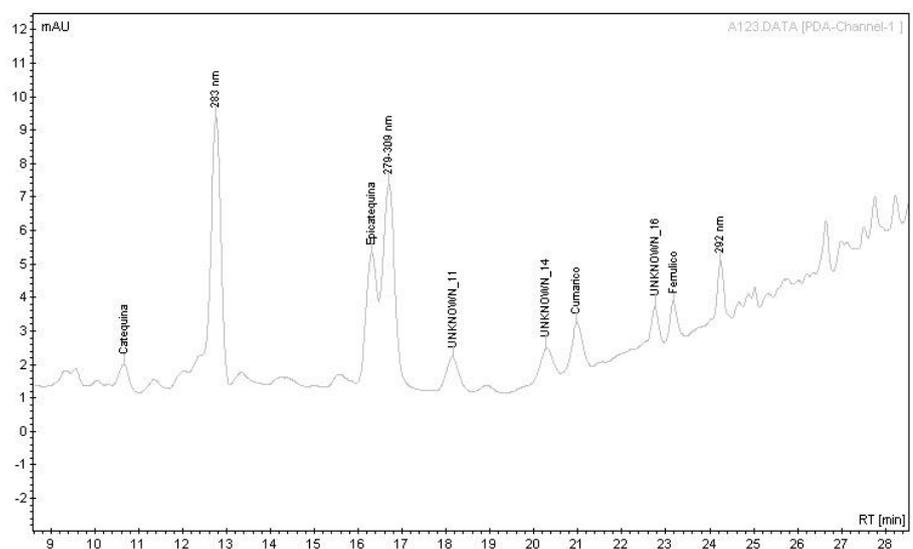
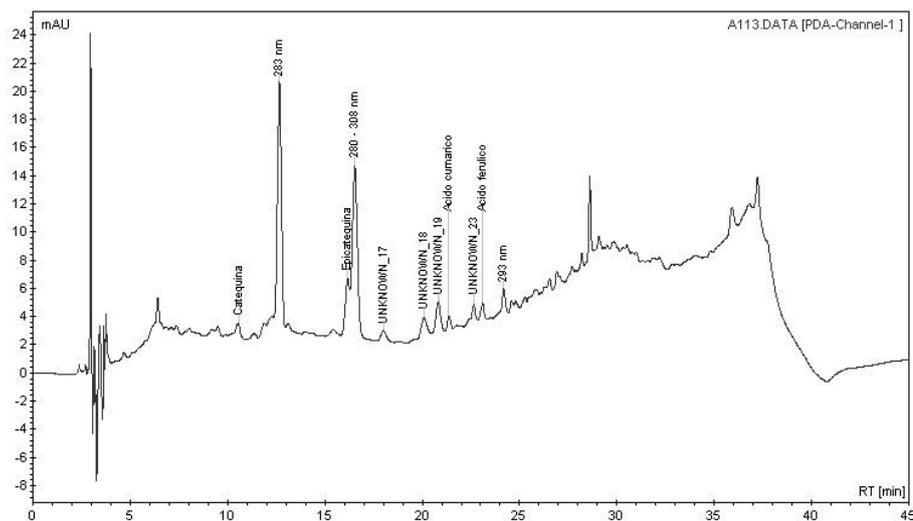
Anexo 01 – Cromatogramas das amostras de extratos do solo obtido com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com as respectivas alturas de pico (mAU) e tempos de retenção (RT [min]). UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. Fonte: do autor, 2016.



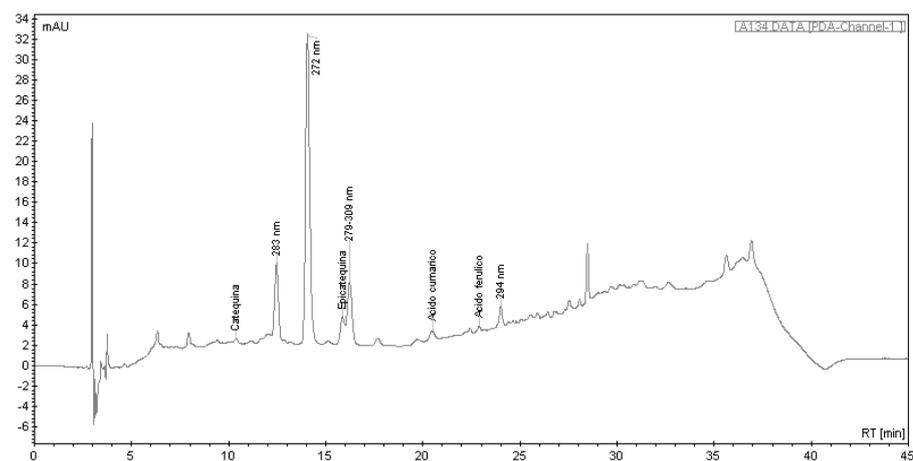
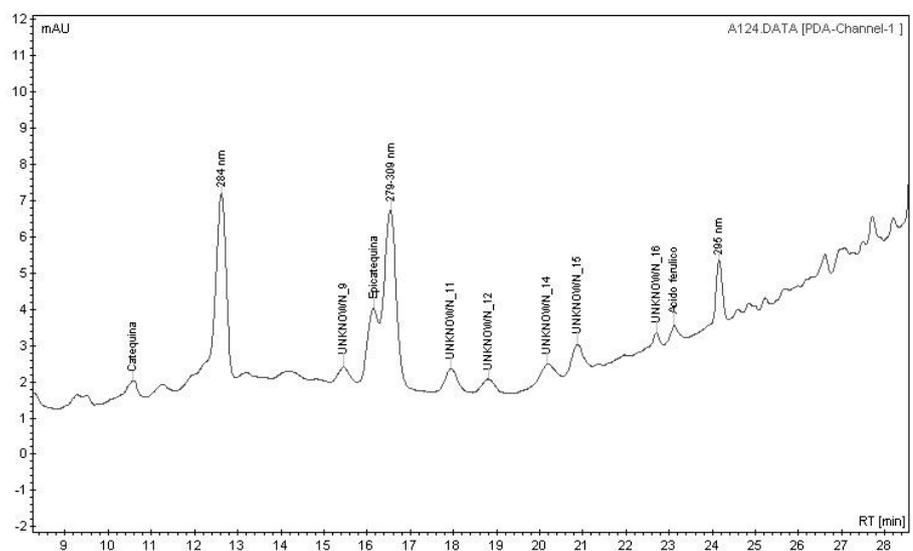
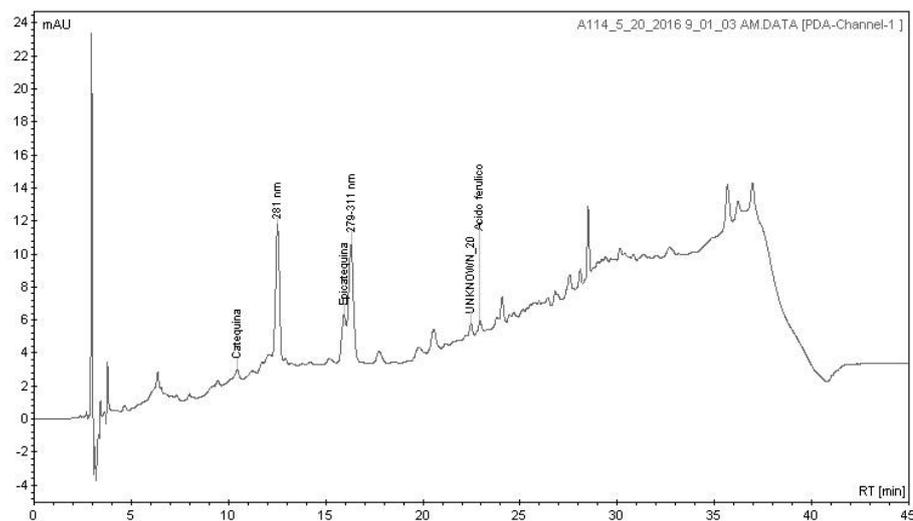
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 0-5 cm de distância horizontal e 0-5 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



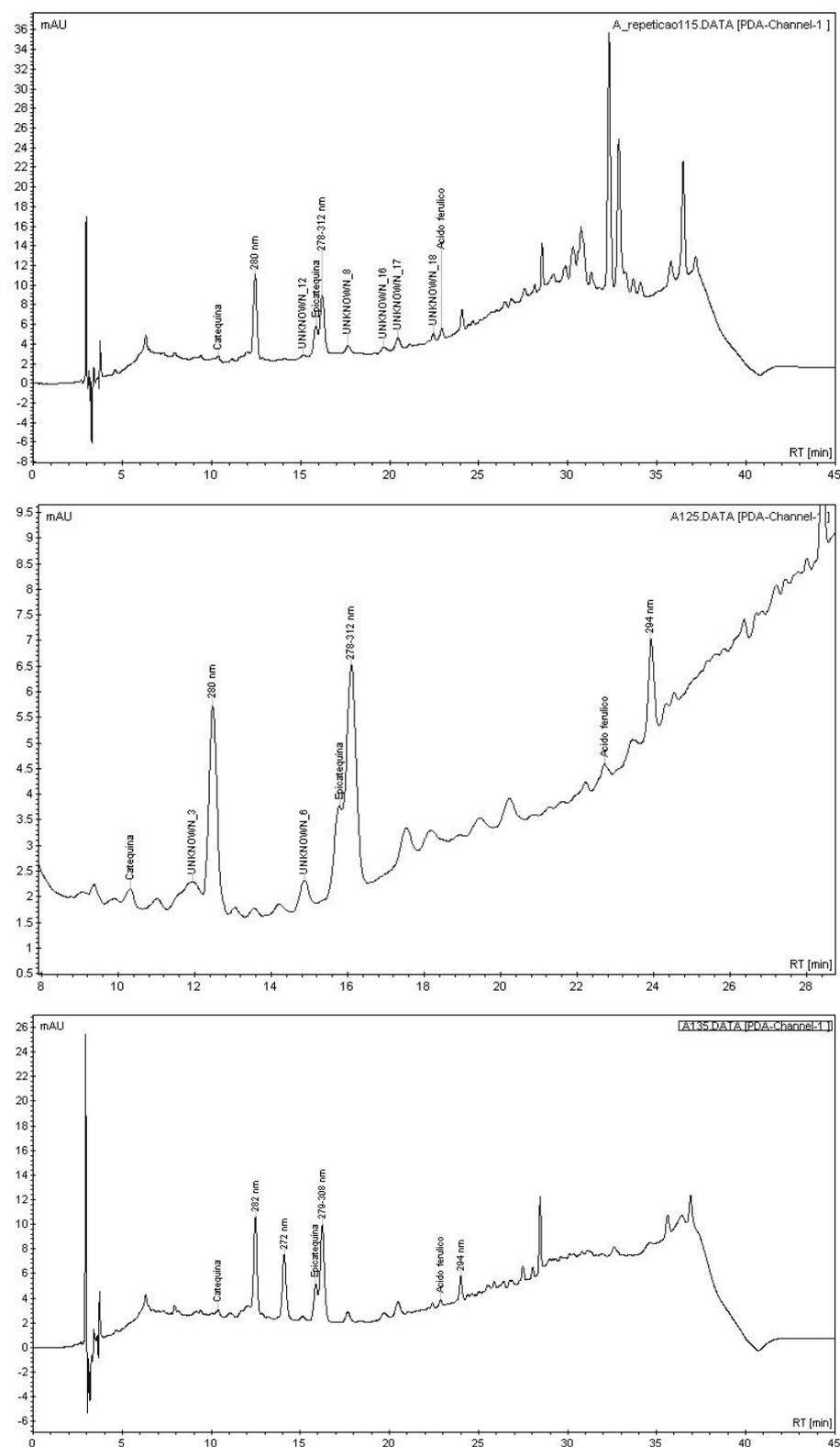
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 5-10 cm de distância horizontal e 0-5 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



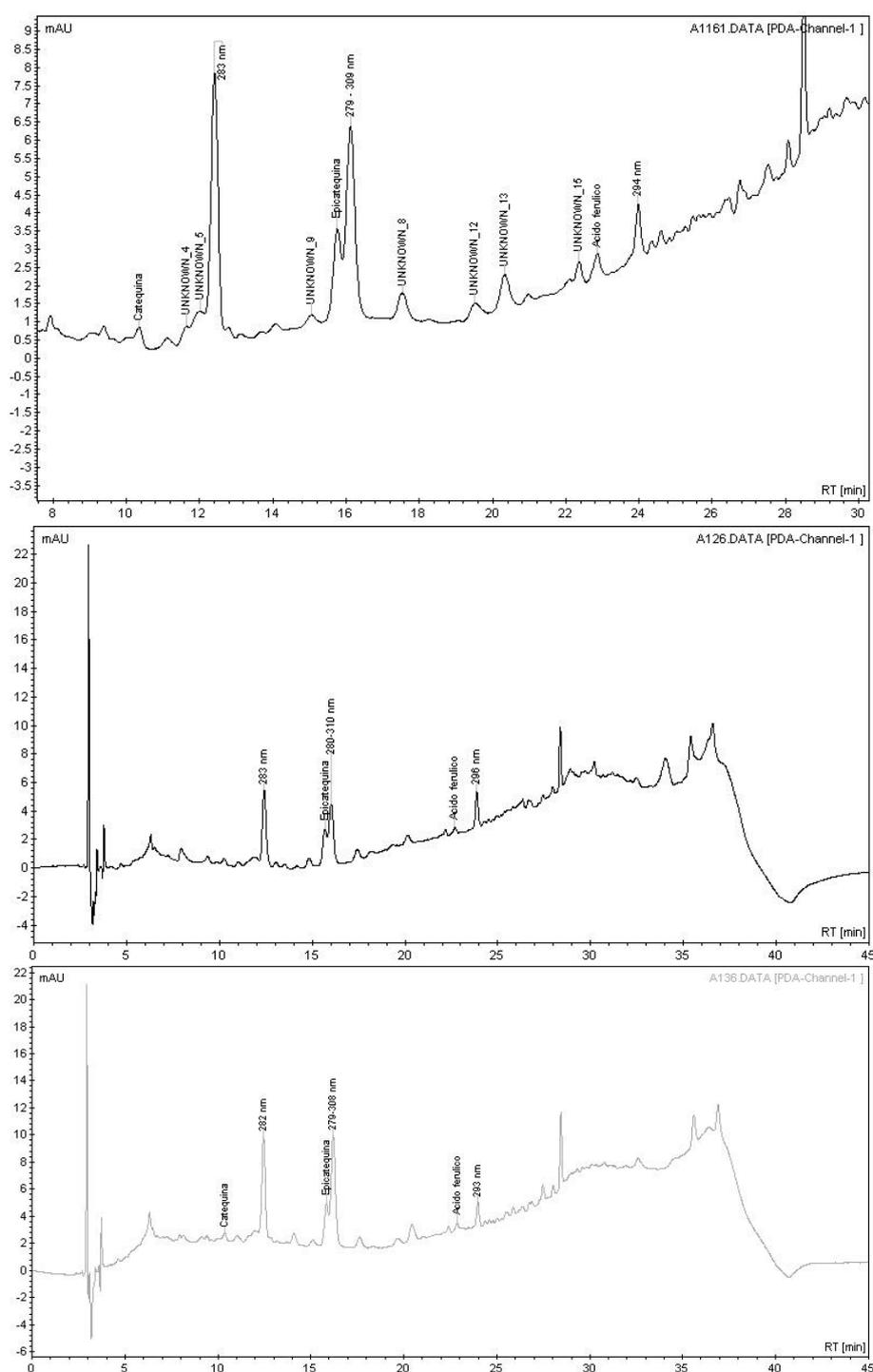
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 10-15 cm de distância horizontal e 0-5 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



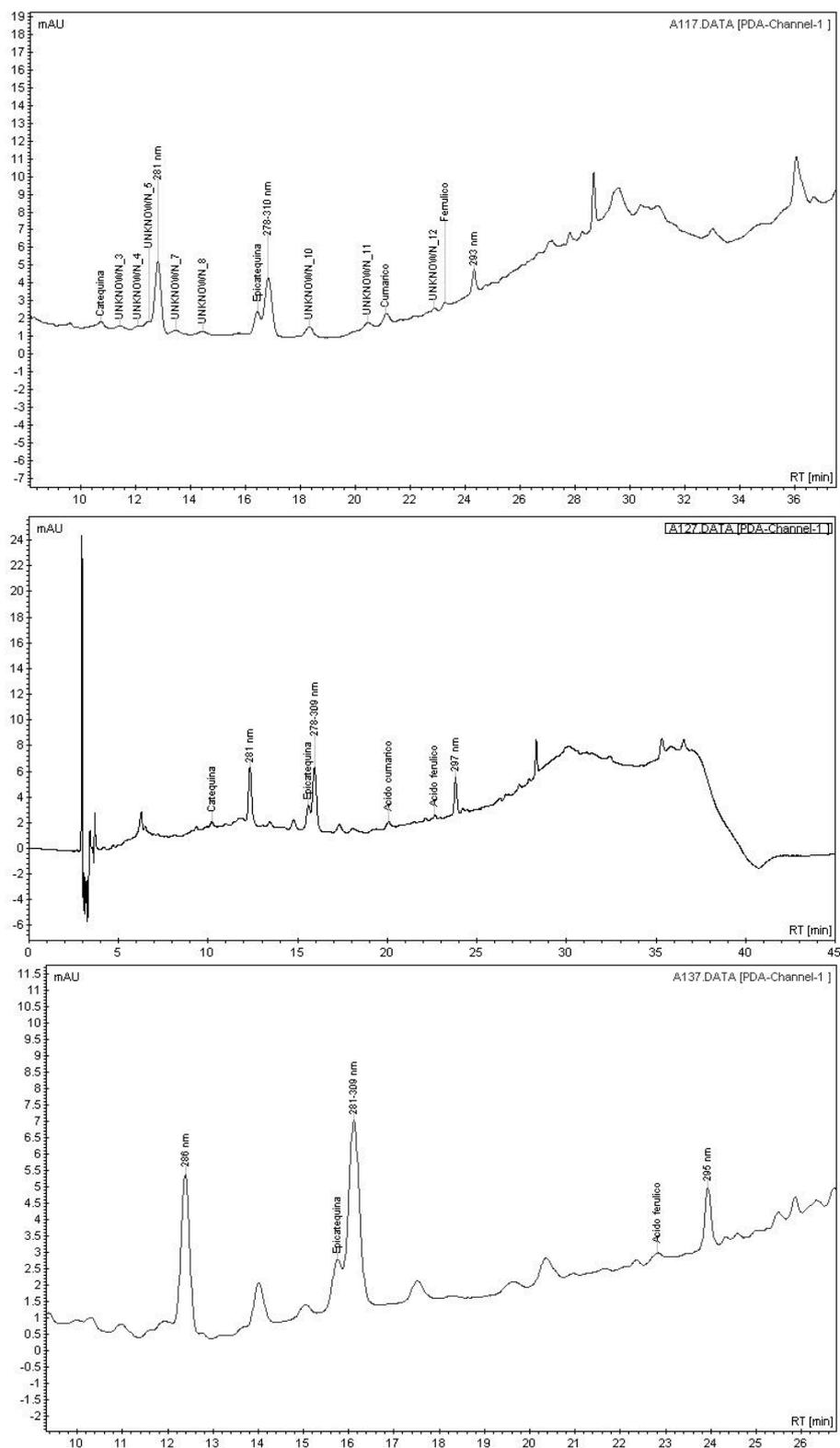
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 0-5 cm de distância horizontal e 5-10 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



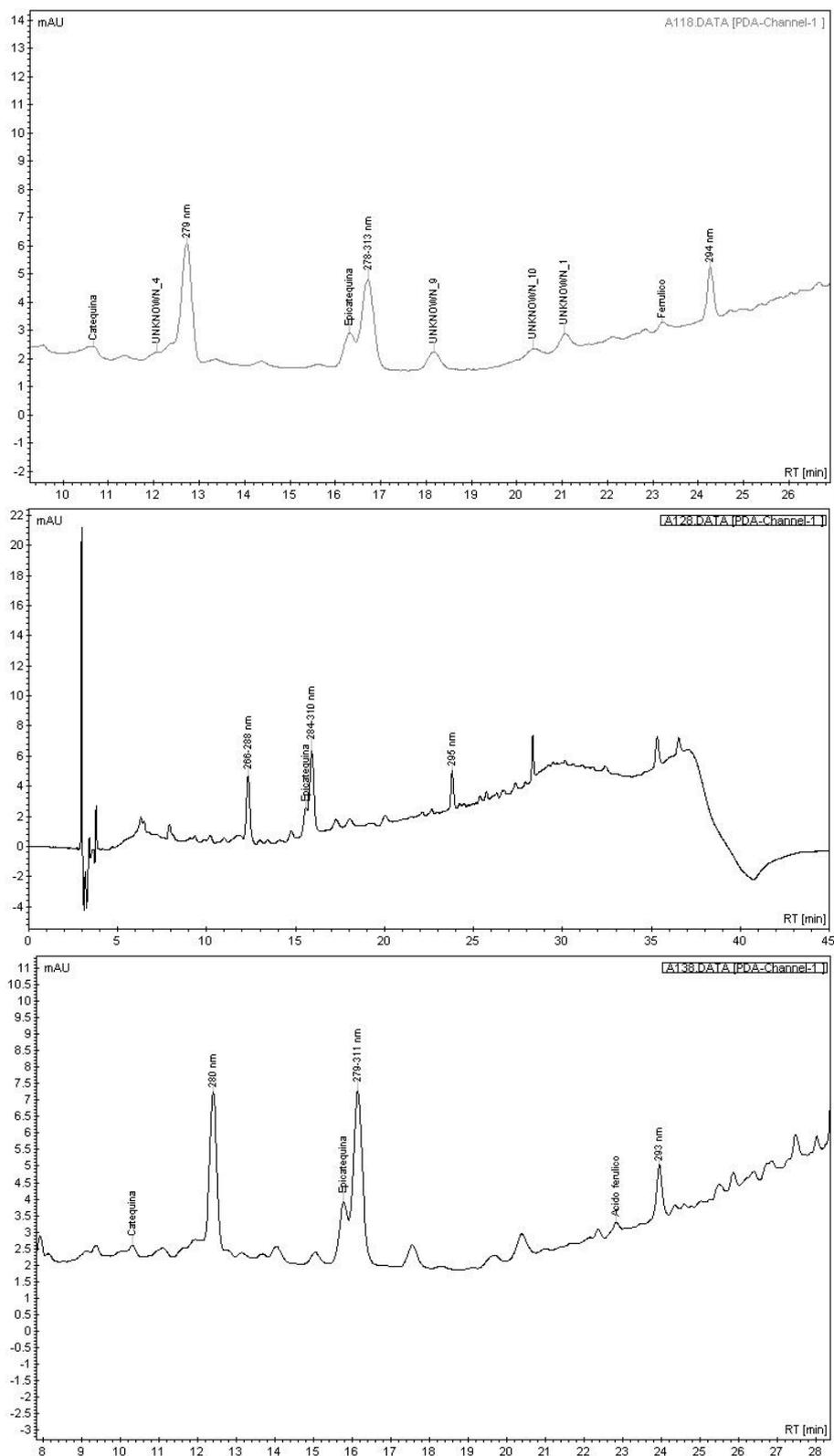
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 5-10 cm de distância horizontal e 5-10 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



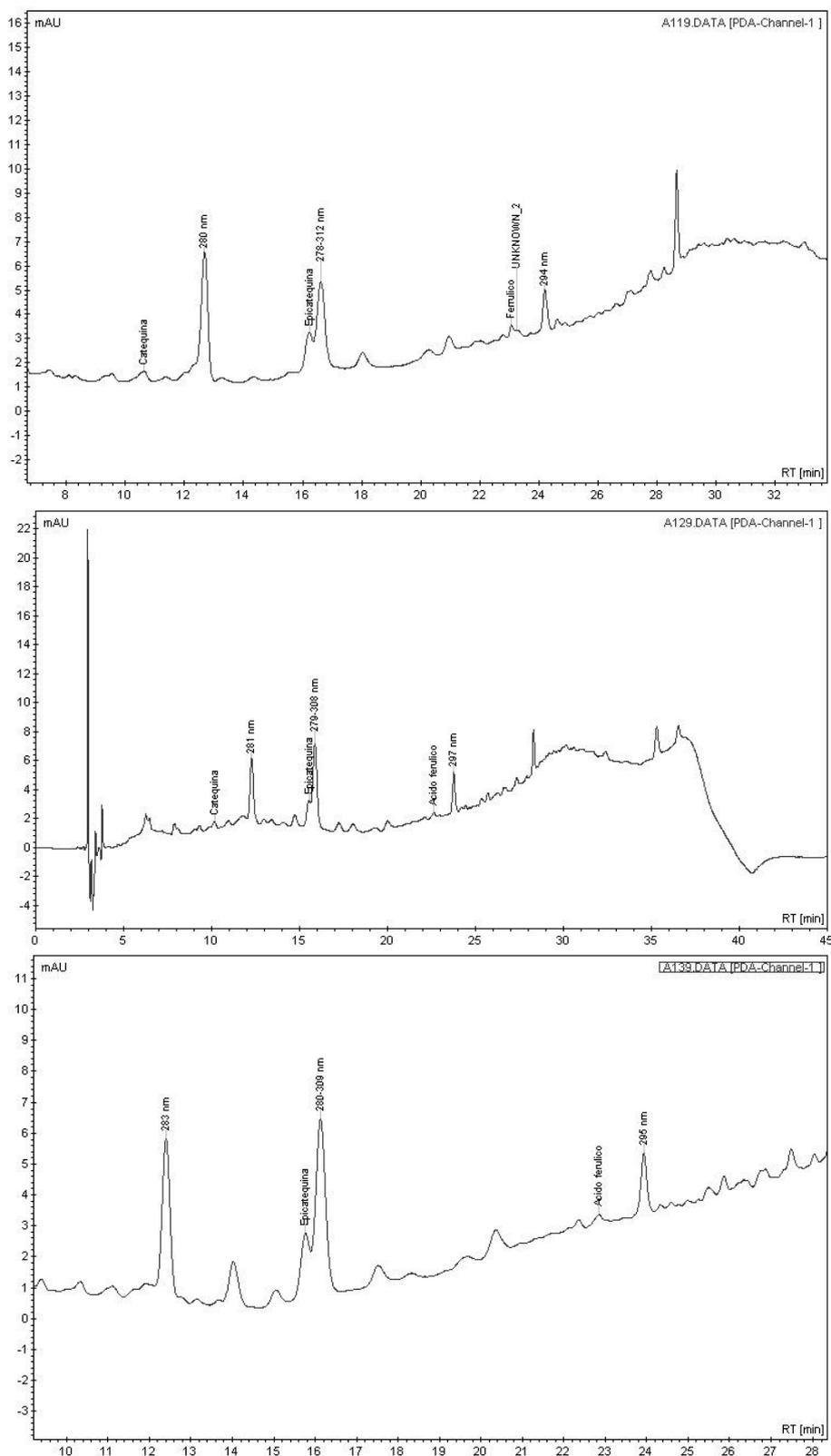
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 10-15 cm de distância horizontal e 5-10 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



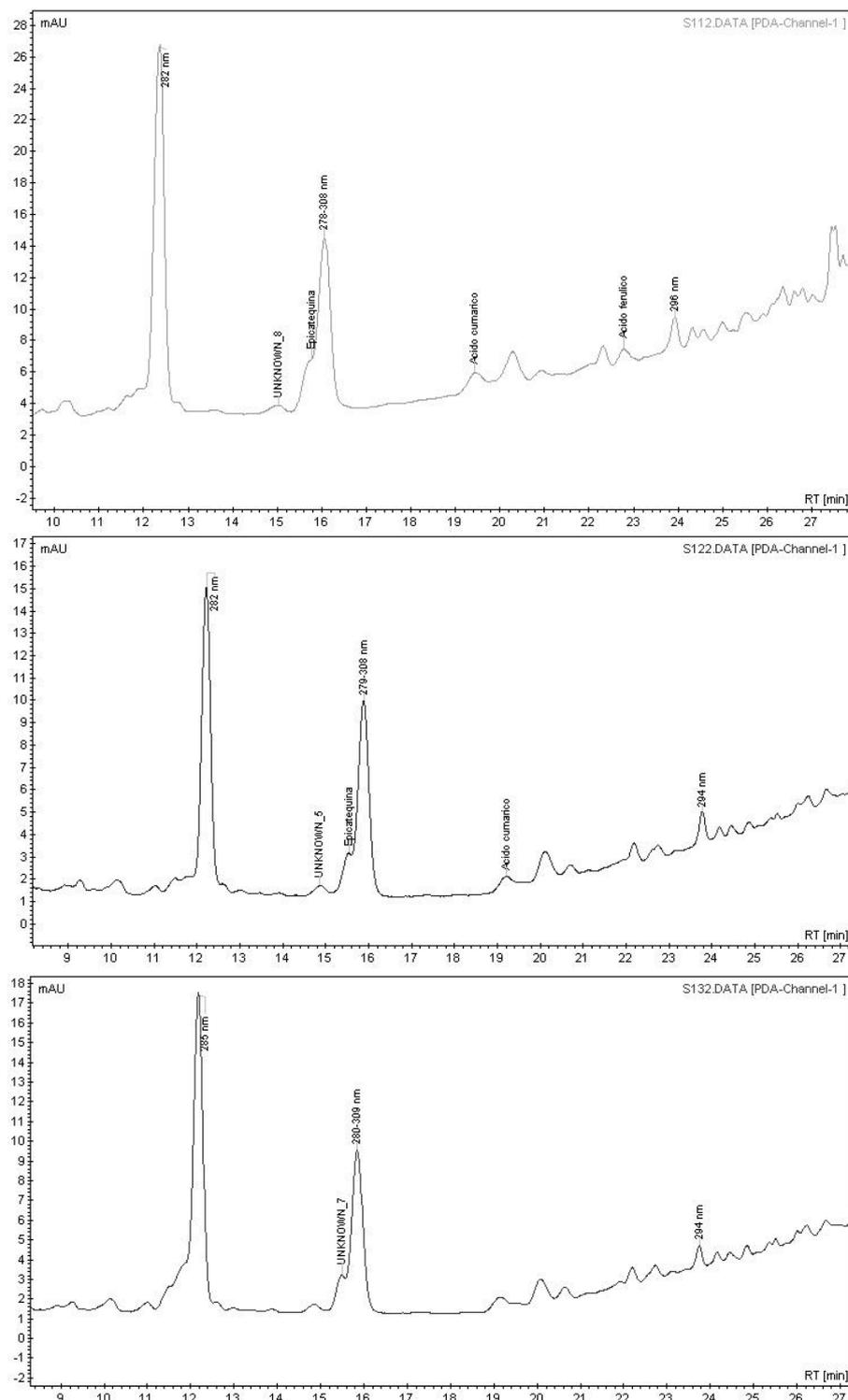
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 0-5 cm de distância horizontal e 10-15 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



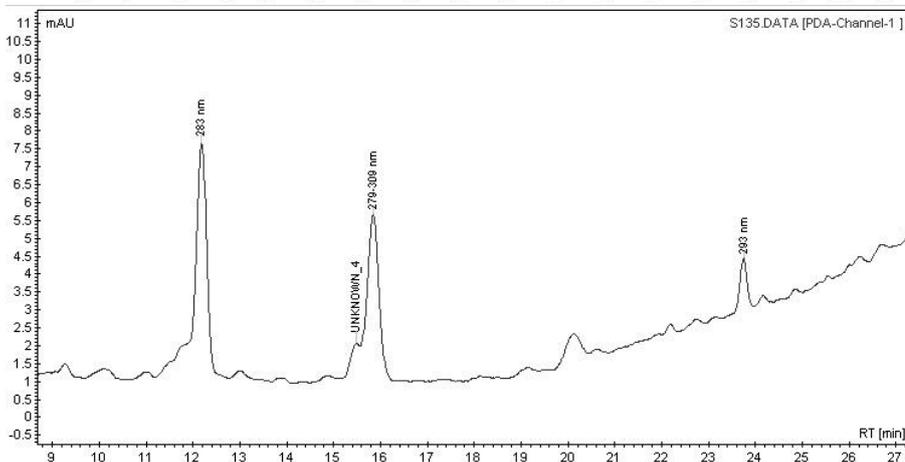
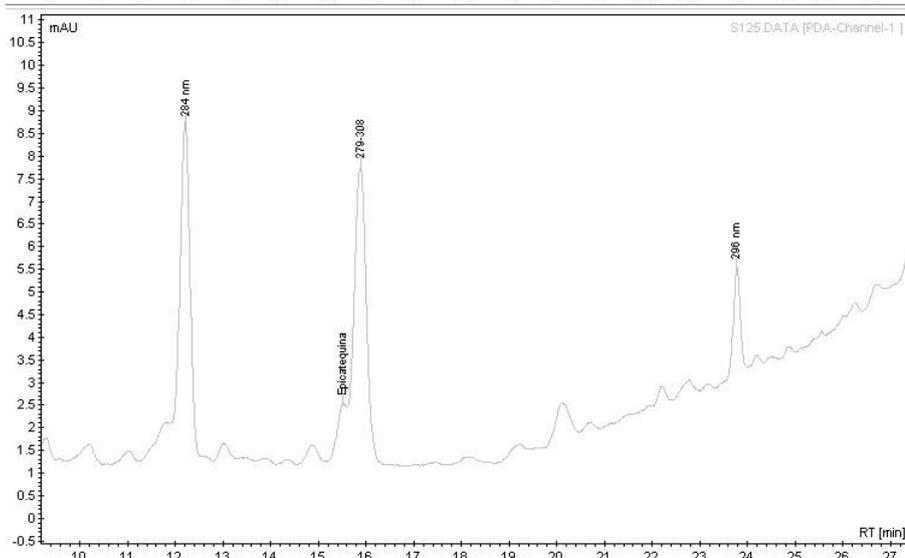
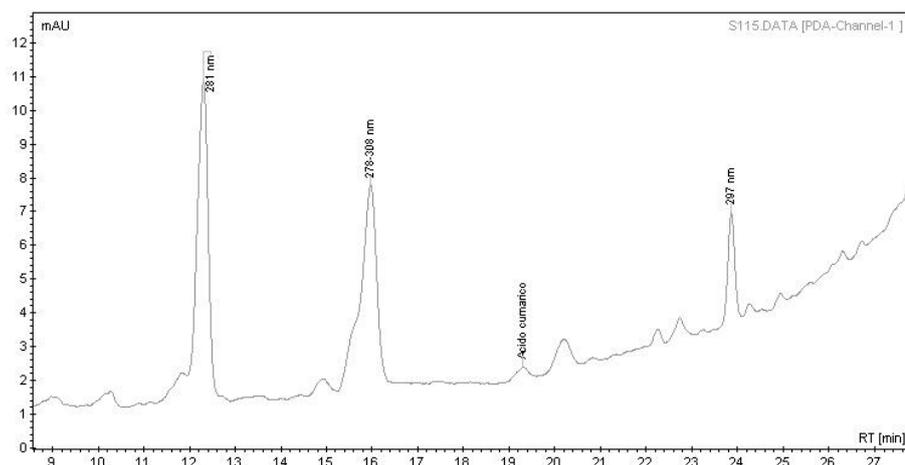
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 5-10 cm de distância horizontal e 10-15 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



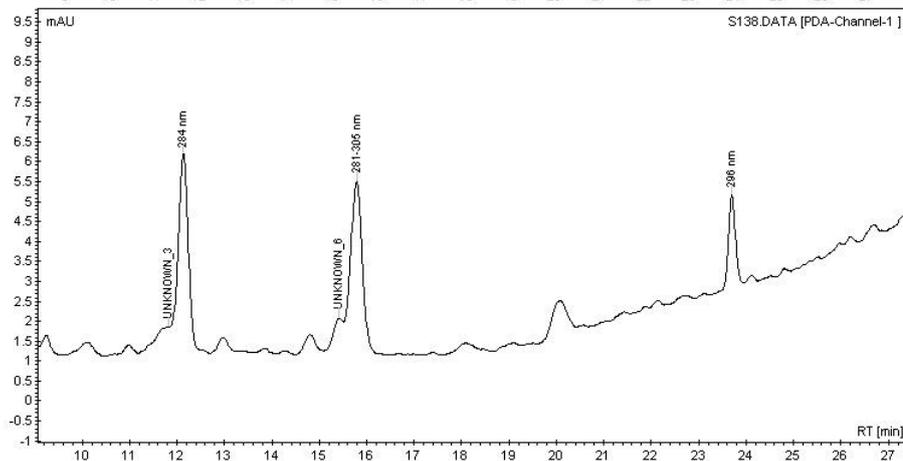
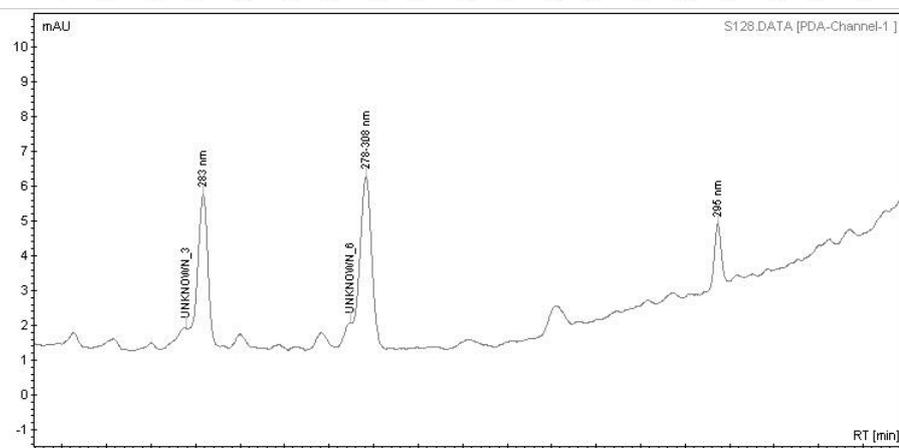
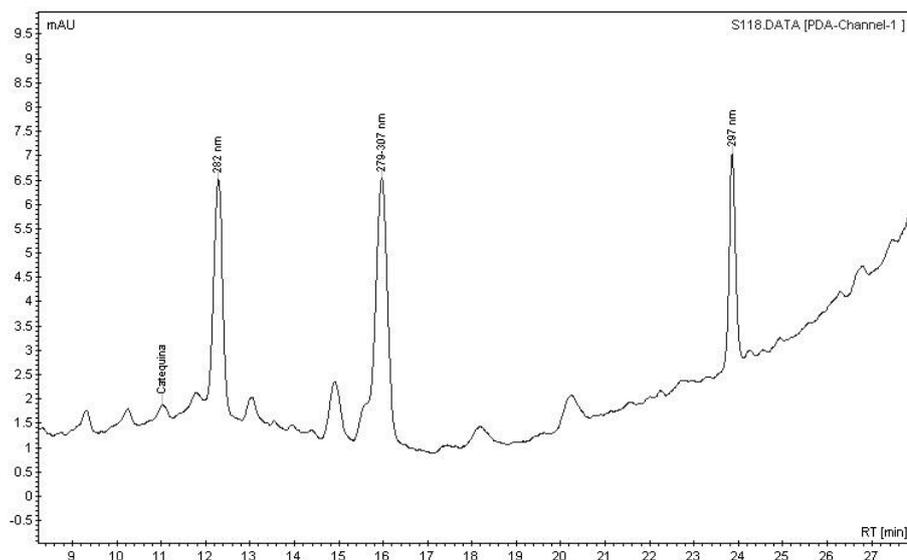
Amostras de solução do solo da área contaminada com capim-annoni-2 10-15 cm de distância horizontal e 10-15 cm de distância vertical da planta doadora, repetições 1, 2 e 3.



Amostras de solução do solo da área livre da presença de capim-annoni-2 0-5 cm de profundidade, repetições 1, 2 e 3.

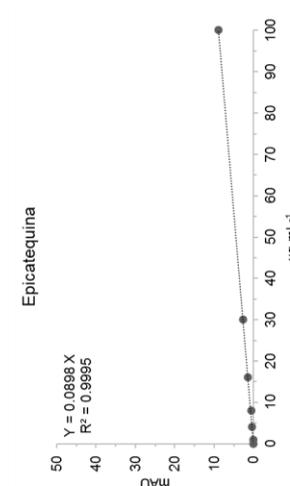
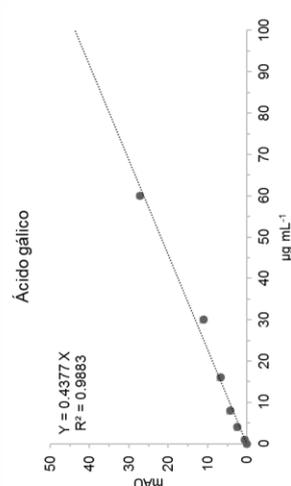
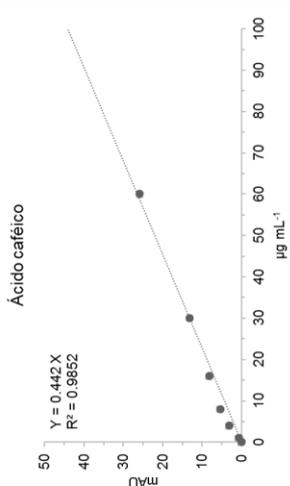
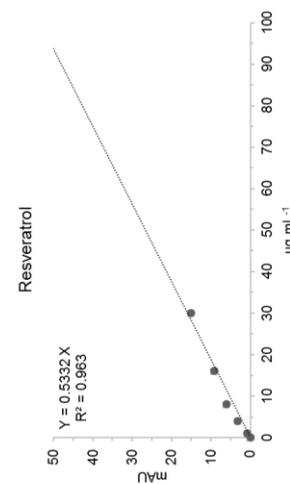
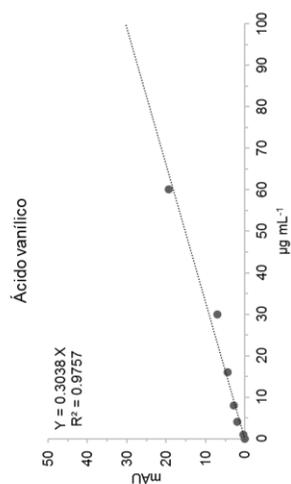
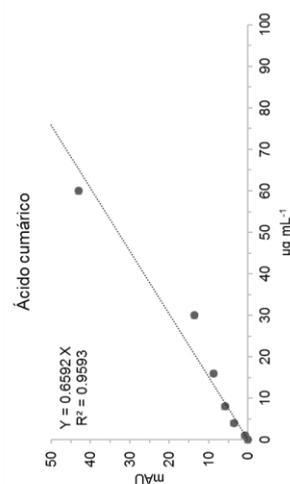
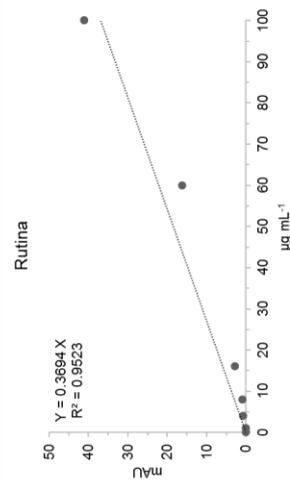
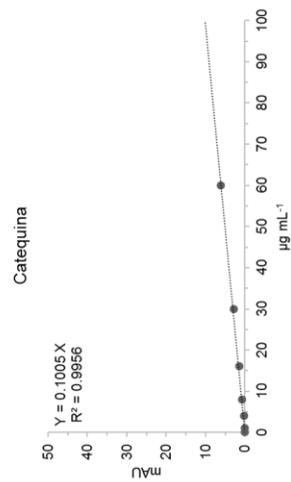
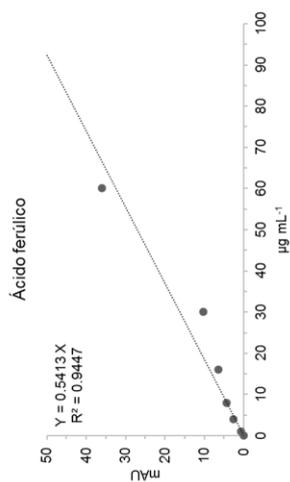


Amostras de solução do solo da área livre da presença de capim-annoni-2 5-10 cm de profundidade, repetições 1, 2 e 3.

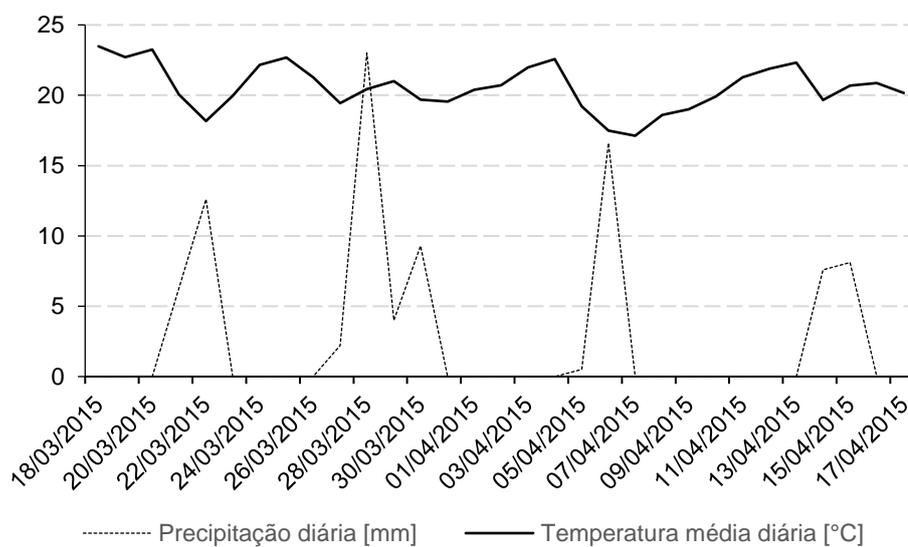


Amostras de solução do solo da área livre da presença de capim-annoni-2 10-15 cm de profundidade, repetições 1, 2 e 3.

Anexo 02 – Curvas de calibração dos padrões utilizados para identificação e quantificação dos compostos fenólicos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Fonte: do autor, 2016.



Anexo 03 – Médias diárias de temperatura [°C] e precipitação [mm] para o município de Chapecó (SC) nos 31 dias anteriores a amostragem de solo (18/03 a 17/04/2015) na Fazenda Pacheco em Abelardo Luz (SC). Fonte: dados do Instituto Nacional de Meteorologia da estação meteorológica de Chapecó, coordenadas: latitude -27.11°; longitude -52.61°, altitude: 679.01 m.



Anexo 4 – Diagramas dos processos envolvidos na análise dos extratos de palhada e solo. Fonte: do autor, 2016.

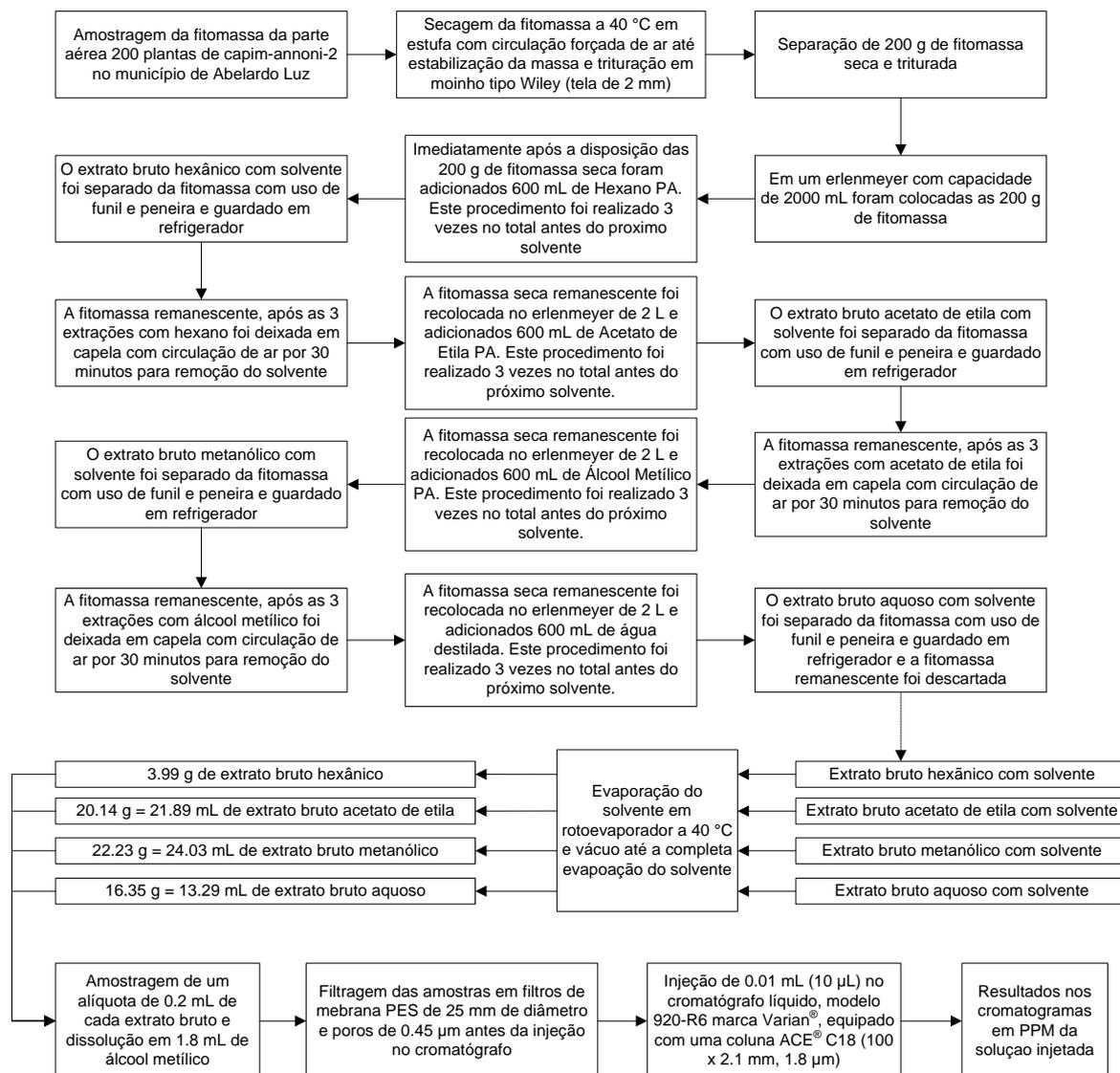


Diagrama da metodologia utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos brutos do capítulo 3.

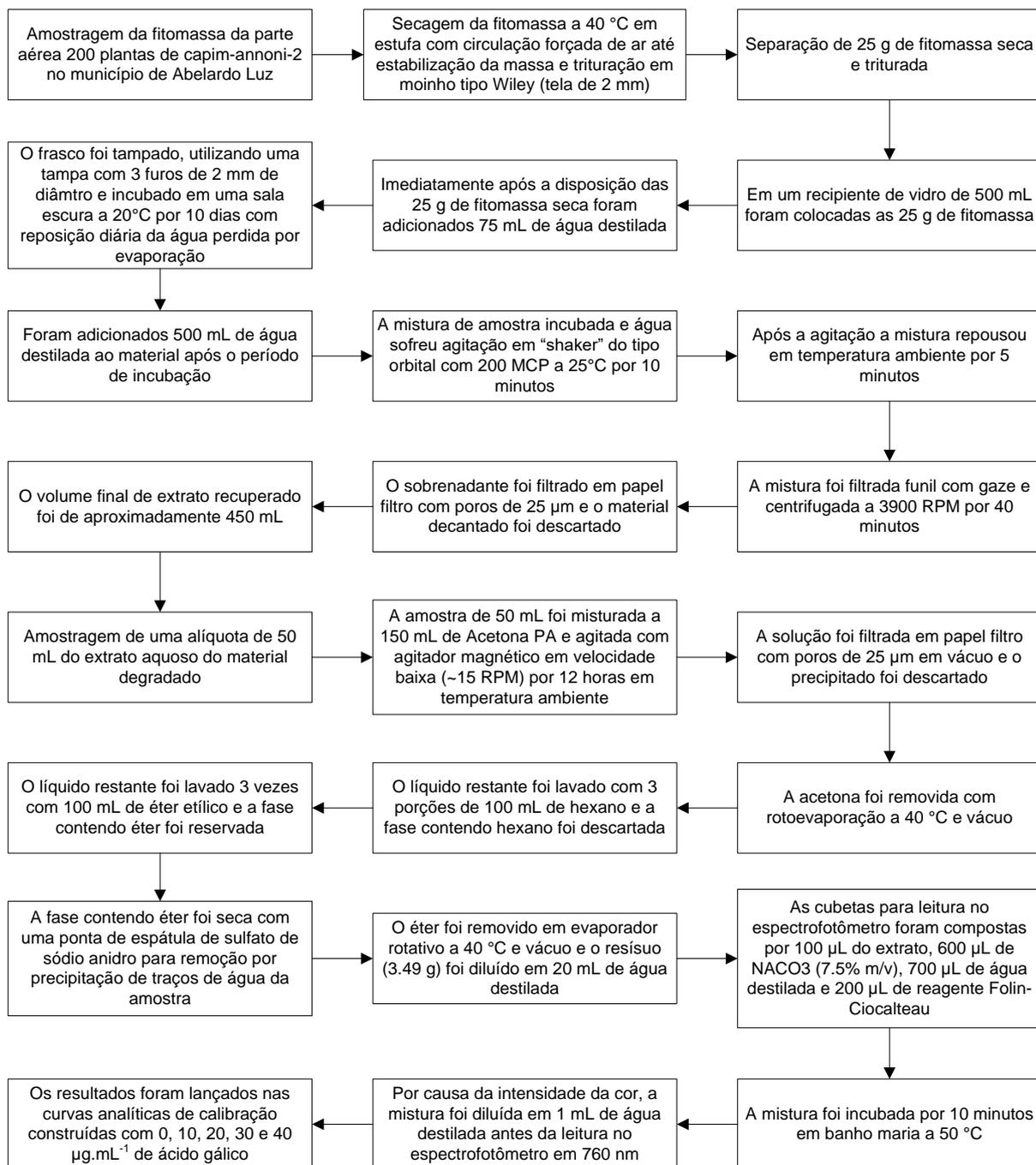


Diagrama da metodologia utilizada para a quantificação de fenóis totais no extrato etéreo do capítulo 4.

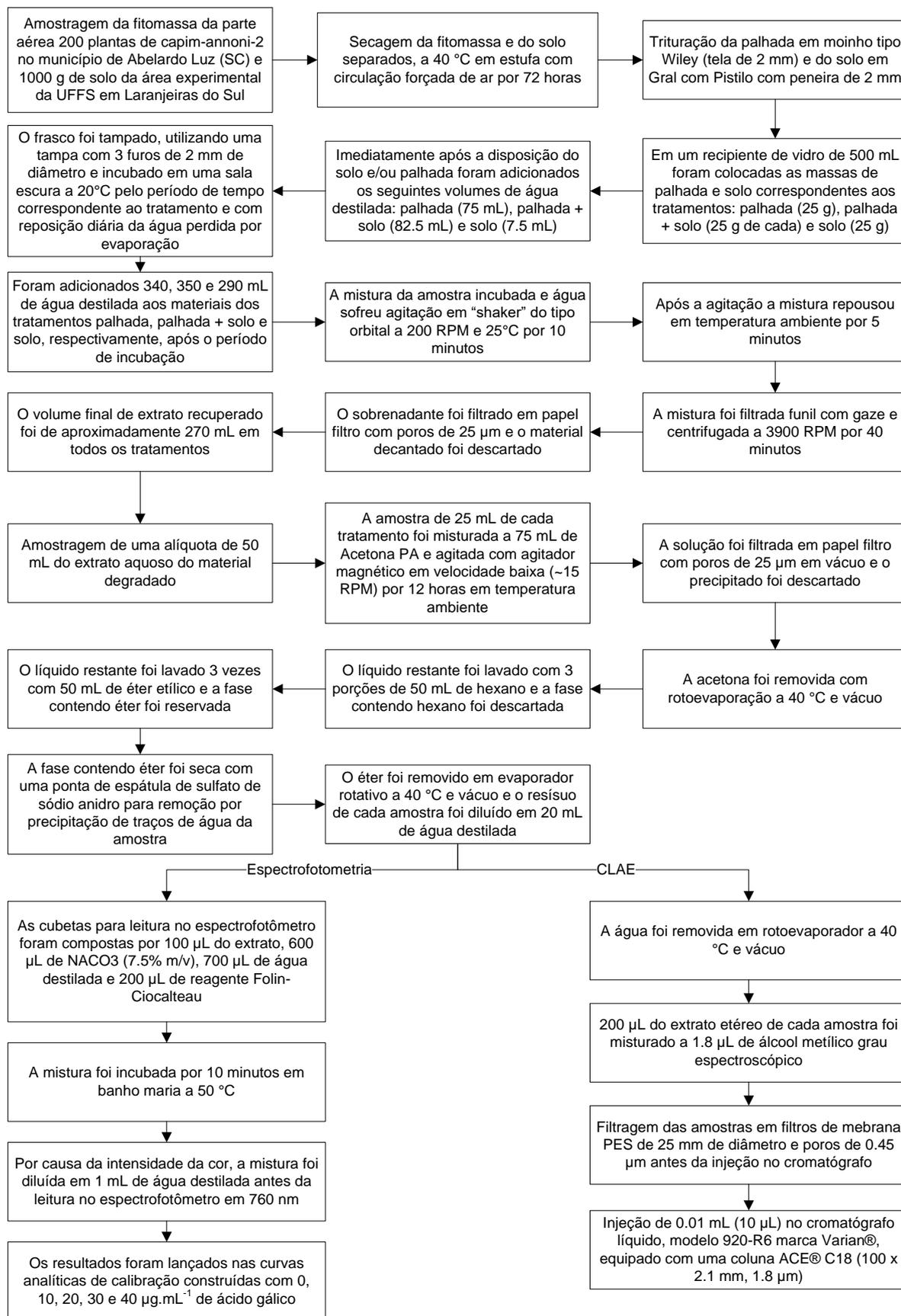


Diagrama da metodologia utilizada para a quantificação de fenóis totais no extrato etéreo do capítulo 5.

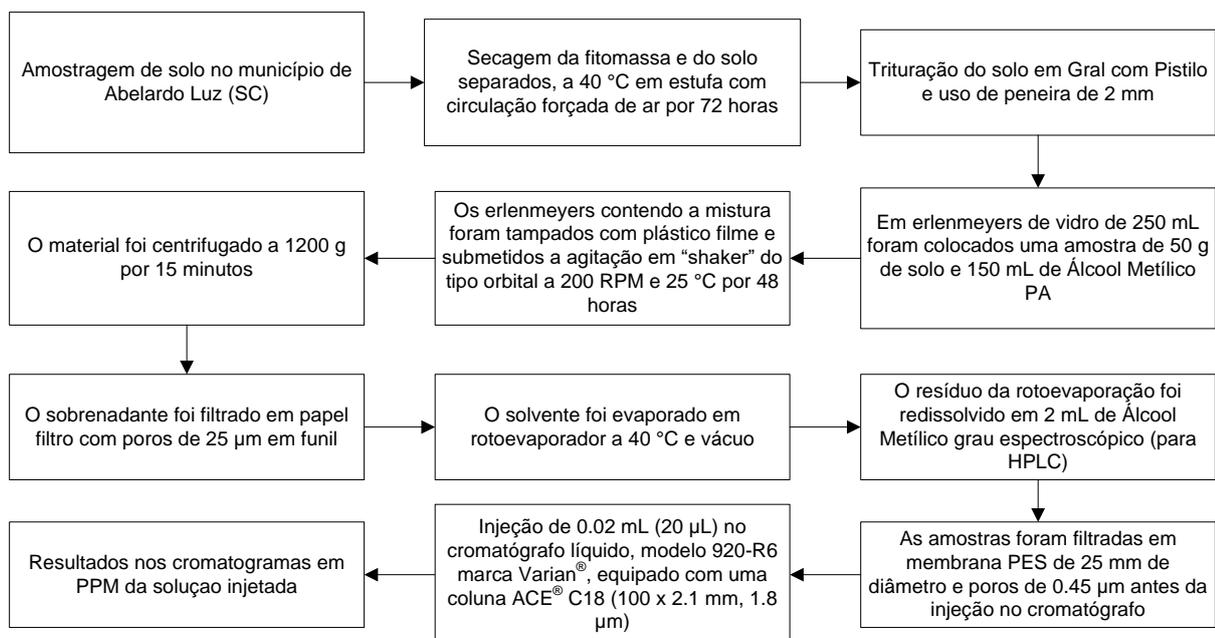


Diagrama da metodologia utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos da solução do solo do capítulo 6.

Anexo 05 – Quadros de análise de variância e teste de hipótese (para análises fatoriais) dos dados dos experimentos de acordo com a figura ou tabela correspondente. Fonte: do autor, 2016.

Figura 3.1 - Anova dos dados finais de germinação de capim-annoni-2 em temperaturas contínuas

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas normais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|--------|----------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 5 | 14968.0 | 2993.6 | 142.5524 | .0 ** |
| RESÍDUO | 18 | 378.0 | 21.0 | | |
| TOTAL | 23 | 15346.0 | | | |
| MÉDIA geral | | 46.5 | | | |
| CV (%) | | 9.85500149452869 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas anormais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 5 | 15.333333 | 3.066667 | 1.4526 | 25.377028 ns |
| RESÍDUO | 18 | 38.0 | 2.111111 | | |
| TOTAL | 23 | 53.333333 | | | |
| MÉDIA geral | | 1.33333333333333 | | | |
| CV (%) | | 108.972473588517 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Sementes quiescentes

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-------------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 5 | 15503.333333 | 3100.666667 | 125.139 | .0 ** |
| RESÍDUO | 18 | 446.0 | 24.777778 | | |
| TOTAL | 23 | 15949.333333 | | | |
| MÉDIA geral | | 47.666666666667 | | | |
| CV (%) | | 10.4427863797679 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Mortalidade

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|-----------------|----------|------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 5 | 142.0 | 28.4 | 8.52 | .027864 ** |
| RESÍDUO | 18 | 60.0 | 3.333333 | | |
| TOTAL | 23 | 202.0 | | | |
| MÉDIA geral | | 4.5 | | | |
| CV (%) | | 40.572041296679 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => IVG

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|------------|----------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 5 | 955.041821 | 191.008364 | 114.6448 | .0 ** |
| RESÍDUO | 18 | 29.9896 | 1.666089 | | |
| TOTAL | 23 | 985.0314 | | | |
| MÉDIA geral | | 8.44541666666667 | | | |
| CV (%) | | 15.2836823559255 | | | |

Tabela 3.1 - Anova dos dados finais de germinação de capim-annoni-2 em temperaturas alternadas

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas normais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 20.666667 | 10.333333 | 1.3099 | 31.673713 ns |
| RESÍDUO | 9 | 71.0 | 7.888889 | | |
| TOTAL | 11 | 91.666667 | | | |
| MÉDIA geral | | 95.833333333333 | | | |
| CV (%) | | 2.93083470371352 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas anormais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | .666667 | .333333 | .2727 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 9 | 11.0 | 1.222222 | | |
| TOTAL | 11 | 11.6667 | | | |
| MÉDIA geral | | 0.83333333333333 | | | |
| CV (%) | | 132.664991614216 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Sementes quiescentes

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 32.666667 | 16.333333 | 3.1957 | 8.939116 ns |
| RESÍDUO | 9 | 46.0 | 5.111111 | | |
| TOTAL | 11 | 78.6667 | | | |
| MÉDIA geral | | 1.66666666666667 | | | |
| CV (%) | | 135.646599662505 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Mortalidade

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|---------|----|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | .666667 | .333333 | .5 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 9 | 6.0 | .666667 | | |
| TOTAL | 11 | 6.6667 | | | |
| MÉDIA geral | | 1.66666666666667 | | | |
| CV (%) | | 48.9897948556636 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => IVG

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|-----------------|----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 18.334017 | 9.167008 | 15.6799 | .116776 ** |
| RESÍDUO | 9 | 5.2617 | .584633 | | |
| TOTAL | 11 | 23.5957 | | | |
| MÉDIA geral | | 21.930833333333 | | | |
| CV (%) | | 3.4864757774938 | | | |

Tabela 3.2 - Anova dos dados finais de germinação de capim-annoni-2 com e sem luz

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas normais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 200.0 | 200.0 | 11.7647 | 1.397011 * |
| RESÍDUO | 6 | 102.0 | 17.0 | | |
| TOTAL | 7 | 302.0 | | | |
| MÉDIA geral | | 89.5 | | | |
| CV (%) | | 4.60682192806443 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas anormais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----|----|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .5 | .5 | .2 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 6 | 15.0 | 2.5 | | |
| TOTAL | 7 | 15.5 | | | |
| MÉDIA geral | | 1.25 | | | |
| CV (%) | | 126.491106406735 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Sementes quiescentes

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 264.5 | 264.5 | 33.766 | .114023 ** |
| RESÍDUO | 6 | 47.0 | 7.833333 | | |
| TOTAL | 7 | 311.5 | | | |
| MÉDIA geral | | 6.75 | | | |
| CV (%) | | 41.4638410462881 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Mortalidade

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 2.0 | 2.0 | .4286 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 6 | 28.0 | 4.666667 | | |
| TOTAL | 7 | 30.0 | | | |
| MÉDIA geral | | 2.5 | | | |
| CV (%) | | 86.4098759787715 | | | |

Figura 3.3 - Anova dos dados finais de germinação de capim-annoni-2 em diferentes potenciais osmóticos no tempo

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Germinação

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|------------|----------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 6 | 38576.857143 | 6429.47619 | 316.2037 | .0 ** |
| RESÍDUO | 21 | 427.0 | 20.333333 | | |
| TOTAL | 27 | 39003.857143 | | | |
| MÉDIA geral | | 57.9285714285714 | | | |
| CV (%) | | 7.78415493705555 | | | |

Tabela 3.3 - Anova dos dados finais de germinação de capim-annoni-2 utilizando as sementes remanescentes do experimento de restrição hídrica (-0,4, -0,8 e -1,2 MPa)

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas normais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 45.982467 | 22.991233 | .954 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 9 | 216.9038 | 24.100422 | | |
| TOTAL | 11 | 262.8863 | | | |
| MÉDIA geral | | 90.1341666666667 | | | |
| CV (%) | | 5.44656734310106 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Plântulas anormais

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 1.784517 | .892258 | .1289 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 9 | 62.2858 | 6.920644 | | |
| TOTAL | 11 | 64.0703 | | | |
| MÉDIA geral | | 2.98583333333333 | | | |
| CV (%) | | 88.1064507480112 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Sementes quiescentes

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 37.266017 | 18.633008 | 1.5084 | 27.228408 ns |
| RESÍDUO | 9 | 111.1745 | 12.352722 | | |
| TOTAL | 11 | 148.4405 | | | |
| MÉDIA geral | | 5.81416666666667 | | | |
| CV (%) | | 60.4496597631115 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Mortalidade de sementes

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 2 | 9.521867 | 4.760933 | 2.9607 | 10.278044 ns |
| RESÍDUO | 9 | 14.4726 | 1.608067 | | |
| TOTAL | 11 | 23.9945 | | | |
| MÉDIA geral | | 1.06333333333333 | | | |
| CV (%) | | 119.25664750518 | | | |

Tabela 4.2 - Anova dos dados de desenvolvimento de plântulas de alfafa e trigo submetidos a tratamentos com os extratos brutos da parte aérea de capim-annoni-2 a 1% (v/v)

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Radícula de alfafa

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 68.20685 | 17.051713 | 12.7735 | .010051 ** |
| RESÍDUO | 15 | 20.0239 | 1.334927 | | |
| TOTAL | 19 | 88.2308 | | | |
| MÉDIA geral | | 13.5725 | | | |
| CV (%) | | 8.51272990205446 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Hipocótilo de alfafa

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 15.85042 | 3.962605 | 6.6944 | .267662 ** |
| RESÍDUO | 15 | 8.8789 | .591927 | | |
| TOTAL | 19 | 24.7293 | | | |
| MÉDIA geral | | 4.4855 | | | |
| CV (%) | | 17.1523287428418 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Radícula de trigo

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|------------|----------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 725.21993 | 181.304983 | 140.8858 | .0 ** |
| RESÍDUO | 15 | 19.3034 | 1.286893 | | |
| TOTAL | 19 | 744.5233 | | | |
| MÉDIA geral | | 11.6615 | | | |
| CV (%) | | 9.72784985652372 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Hipocótilo de trigo

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 72.11815 | 18.029538 | 20.8339 | .0 ** |
| RESÍDUO | 15 | 12.9809 | .865393 | | |
| TOTAL | 19 | 85.099 | | | |
| MÉDIA geral | | 5.01 | | | |
| CV (%) | | 18.5681675681418 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Total de alfafa

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 127.02785 | 31.756963 | 11.7186 | .016199 ** |
| RESÍDUO | 15 | 40.6495 | 2.709967 | | |
| TOTAL | 19 | 167.6774 | | | |
| MÉDIA geral | | 18.0575 | | | |
| CV (%) | | 9.11642053997128 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Total de trigo

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|------------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 4 | 1111.28707 | 277.821768 | 88.308 | .0 ** |
| RESÍDUO | 15 | 47.1908 | 3.146053 | | |
| TOTAL | 19 | 1158.4779 | | | |
| MÉDIA geral | | 16.672 | | | |
| CV (%) | | 10.6388659973323 | | | |

Figura 5.1 - Anova e teste de hipótese da germinação de alfafa no tempo, com extrato de capim-annoni-2 e água destilada

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====> Alfafa

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|-----|-------------------|------------|-----------|
| TRATAMENTOS | 8 | 41291.66667 | 5161.45833 | 107.92594 |
| AMBIENTES | 1 | 1916.89815 | 1916.89815 | 40.08228 |
| TRATxAMB | 8 | 1010.18519 | 126.27315 | 2.64037 |
| RESÍDUO | 90 | 4304.16667 | 47.82407 | |
| TOTAL | 107 | 48522.91667 | | |
| MÉDIA | | 33.19444444444444 | | |
| CV(%) | | 20.8332910254409 | | |

Teste de Hipótese

| FV | TESTE | GL NUM | GL DEN | F | PROBABILIDADE (%) |
|------------|----------|--------|--------|-----------|-------------------|
| Tratamento | QMG/QMR | 8 | 90 | 107.92594 | .0 ** |
| Ambiente | QMA/QMR | 1. | 90. | 40.08228 | .0 ** |
| Trat x Amb | QMGA/QMR | 8 | 90 | 2.64037 | 1.20182 * |

Figura 5.2 - Anova e teste de hipótese da germinação de braquiária no tempo, com extrato de capim-annoni-2 e água destilada

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====> Braquiaria

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|-------------------|------------|-------------|-----------|
| TRATAMENTOS | 11 | 155537.5 | 14139.77273 | 227.75473 |
| AMBIENTES | 1 | 1950.69444 | 1950.69444 | 31.42058 |
| TRATxAMB | 11 | 1161.80556 | 105.61869 | 1.70124 |
| RESÍDUO | 120 | 7450.0 | 62.08333 | |
| TOTAL | 143 | 166100.0 | | |
| MÉDIA | 48.33333333333333 | | | |
| CV(%) | 16.3019953842384 | | | |

Teste de Hipótese

| FV | TESTE | GL NUM | GL DEN | F | PROBABILIDADE (%) |
|------------|----------|--------|--------|-----------|-------------------|
| Tratamento | QMG/QMR | 11 | 120 | 227.75473 | .0 ** |
| Ambiente | QMA/QMR | 1. | 120. | 31.42058 | .0 ** |
| Trat x Amb | QMGA/QMR | 11 | 120 | 1.70124 | 8.09012 ns |

Figura 5.3 - Anova e teste de hipótese da germinação de trigo no tempo, com extrato de capim-annoni-2 e água destilada

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====> Trigo

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|------------------|--------------|------------|-----------|
| TRATAMENTOS | 6 | 127452.97619 | 21242.1627 | 445.52851 |
| AMBIENTES | 1 | 24.10714 | 24.10714 | .50562 |
| TRATxAMB | 6 | 236.30952 | 39.38492 | .82605 |
| RESÍDUO | 70 | 3337.5 | 47.67857 | |
| TOTAL | 83 | 131050.89286 | | |
| MÉDIA | 44.4642857142857 | | | |
| CV(%) | 15.5292434035624 | | | |

Teste de Hipótese

| FV | TESTE | GL NUM | GL DEN | F | PROBABILIDADE (%) |
|------------|----------|--------|--------|-----------|-------------------|
| Tratamento | QMG/QMR | 6 | 70 | 445.52851 | .0 ** |
| Ambiente | QMA/QMR | 1. | 70. | .50562 | 100.0 ns |
| Trat x Amb | QMGA/QMR | 6 | 70 | .82605 | 100.0 ns |

Tabela 5.3 - Anova das variáveis plântulas normais, anormais, sementes quiescentes, mortalidade e índice de velocidade de germinação de alfafa, braquiária e trigo, com extrato de capim-annoni-2 e água destilada

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Alfafa - NORMAIS

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|------------------|-------------|------------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 833.333333 | 833.333333 | 11.3636 | .71095 ** |
| RESÍDUO | 10 | 733.333333 | 73.333333 | | |
| TOTAL | 11 | 1566.666667 | | | |
| MÉDIA geral | 51.6666666666667 | | | | |
| CV (%) | 16.5744936498904 | | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiária - QUIESCENTES

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 6.75 | 6.75 | .2462 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 274.166667 | 27.416667 | | |
| TOTAL | 11 | 280.916667 | | | |
| MÉDIA geral | | 10.0833333333333 | | | |
| CV (%) | | 51.9281919748926 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiária - MORTALIDADE

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .083333 | .083333 | .004 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 208.833333 | 20.883333 | | |
| TOTAL | 11 | 208.916667 | | | |
| MÉDIA geral | | 6.08333333333333 | | | |
| CV (%) | | 75.1204699570486 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiária - IVG

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|--------------------------------|---------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .600023 | .600023 | 3.9364 | 7.537438 ns |
| RESÍDUO | 10 | 1.524275 | .152427 | | |
| TOTAL | 11 | 2.124298 | | | |
| MÉDIA geral | | 2.9865079364166666666666666667 | | | |
| CV (%) | | 13.072780483590922603139238931 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - NORMAIS

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 8.333333 | 8.333333 | .1563 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 533.333333 | 53.333333 | | |
| TOTAL | 11 | 541.666667 | | | |
| MÉDIA geral | | 85.8333333333333 | | | |
| CV (%) | | 8.50831157289575 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - ANORMAIS

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 14.083333 | 14.083333 | .5483 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 256.833333 | 25.683333 | | |
| TOTAL | 11 | 270.916667 | | | |
| MÉDIA geral | | 5.08333333333333 | | | |
| CV (%) | | 99.6958556751823 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - QUIESCENTES

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .083333 | .083333 | .0097 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 86.166667 | 8.616667 | | |
| TOTAL | 11 | 86.25 | | | |
| MÉDIA geral | | 3.75 | | | |
| CV (%) | | 78.2777580632417 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - MORTALIDADE

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 3.0 | 3.0 | .1565 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 191.666667 | 19.166667 | | |
| TOTAL | 11 | 194.666667 | | | |
| MÉDIA geral | | 6.33333333333333 | | | |
| CV (%) | | 69.1259238766511 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - IVG

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|--------------------------------|---------|-------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .001644 | .001644 | .0118 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 1.39355 | .139355 | | |
| TOTAL | 11 | 1.395194 | | | |
| MÉDIA geral | | 4.0375000001666666666666666667 | | | |
| CV (%) | | 9.245889430013205802682633403 | | | |

Tabela 5.4 - Anova das variáveis comprimento de radícula, hipocótilo, total e massa de plântulas de alfafa, braquiária e trigo, com extrato de capim-annoni-2 e água destilada

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Alfafa - RADICULA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|-------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 69.639372 | 69.639372 | 20.6086 | .107534 ** |
| RESÍDUO | 10 | 33.7914 | 3.37914 | | |
| TOTAL | 11 | 103.4308 | | | |
| MÉDIA geral | | 24.21483333333333 | | | |
| CV (%) | | 7.59139533084878 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Alfafa - HIPOCOTILO

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade(%) |
|-------------|----|-------------------|---------|-------|------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | .172081 | .172081 | .5875 | 100.0 ns |
| RESÍDUO | 10 | 2.9288 | .29288 | | |
| TOTAL | 11 | 3.1009 | | | |
| MÉDIA geral | | 4.215916666666667 | | | |
| CV (%) | | 12.8366836967178 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Alfafa - TOTAL

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 76.734919 | 76.734919 | 31.1279 | .023444 ** |
| RESÍDUO | 10 | 24.6515 | 2.46515 | | |
| TOTAL | 11 | 101.3864 | | | |
| MÉDIA geral | | 28.43075 | | | |
| CV (%) | | 5.52246991660687 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Alfafa - MASSA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 18.75 | 18.75 | 1.2058 | 29.79117 ns |
| RESÍDUO | 10 | 155.5 | 15.55 | | |
| TOTAL | 11 | 174.25 | | | |
| MÉDIA geral | | 23.5 | | | |
| CV (%) | | 16.7802077898982 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiaria - RADICULA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 51.933441 | 51.933441 | 22.8425 | .074651 ** |
| RESÍDUO | 10 | 22.7354 | 2.27354 | | |
| TOTAL | 11 | 74.6688 | | | |
| MÉDIA geral | | 31.2236666666667 | | | |
| CV (%) | | 4.82911333263435 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiaria - HIPOCOTILO

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 6.021117 | 6.021117 | 2.4764 | 14.665596 ns |
| RESÍDUO | 10 | 24.3144 | 2.43144 | | |
| TOTAL | 11 | 30.3355 | | | |
| MÉDIA geral | | 10.35785 | | | |
| CV (%) | | 15.0543552824274 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiaria - TOTAL

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 93.321057 | 93.321057 | 11.2866 | .724779 ** |
| RESÍDUO | 10 | 82.683 | 8.2683 | | |
| TOTAL | 11 | 176.0041 | | | |
| MÉDIA geral | | 41.5815166666667 | | | |
| CV (%) | | 6.91524843311682 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Braquiaria - MASSA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|--------------------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 20.18586 | 20.18586 | 8.5114 | 1.537974 * |
| RESÍDUO | 10 | 23.716297 | 2.37163 | | |
| TOTAL | 11 | 43.902157 | | | |
| MÉDIA geral | | 29.0228125 | | | |
| CV (%) | | 5.3062040325122177597364142431 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - RADICULA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 16.303014 | 16.303014 | 7.6716 | 1.980668 * |
| RESÍDUO | 10 | 21.251 | 2.1251 | | |
| TOTAL | 11 | 37.554 | | | |
| MÉDIA geral | | 12.9254166666667 | | | |
| CV (%) | | 11.2783387229928 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - HIPOCOTILO

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 8.393441 | 8.393441 | 2.0988 | 17.804877 ns |
| RESÍDUO | 10 | 39.9923 | 3.99923 | | |
| TOTAL | 11 | 48.3857 | | | |
| MÉDIA geral | | 20.7466666666667 | | | |
| CV (%) | | 9.63917492320877 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - TOTAL

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|------------------|-----------|--------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 48.092044 | 48.092044 | 8.8856 | 1.379902 * |
| RESÍDUO | 10 | 54.1238 | 5.41238 | | |
| TOTAL | 11 | 102.2158 | | | |
| MÉDIA geral | | 33.6720833333333 | | | |
| CV (%) | | 6.90914254278928 | | | |

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => Trigo - MASSA

| FV | GL | SQ | QM | F | Probabilidade (%) |
|-------------|----|-----------------|-----------|---------|-------------------|
| TRATAMENTOS | 1 | 44.814675 | 44.814675 | 15.1251 | .301406 ** |
| RESÍDUO | 10 | 29.6294 | 2.96294 | | |
| TOTAL | 11 | 74.4441 | | | |
| MÉDIA geral | | 15.8075 | | | |
| CV (%) | | 10.889256754685 | | | |

Figura 6.1 - Anova da variável comprimento de radícula de plântulas de trigo com extratos aquosos de materiais incubados por diferentes períodos

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====> COMP RAD

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|-----------------------------------|-----------|----------|
| TRATAMENTOS | 5 | 575.64948 | 115.1299 | 8.09518 |
| AMBIENTES | 2 | 1159.34688 | 579.67344 | 40.75886 |
| TRATxAMB | 10 | 756.17295 | 75.6173 | 5.31692 |
| RESÍDUO | 54 | 767.98918 | 14.22202 | |
| TOTAL | 71 | 3259.15848 | | |
| MÉDIA | | 31.660491674583333333333333333333 | | |
| CV(%) | | 11.911405674340845046198797504 | | |

Teste de Hipótese

| FV | TESTE | GL NUM | GL DEN | F | PROBABILIDADE (%) |
|------------|----------|--------|--------|----------|-------------------|
| Tratamento | QMG/QMR | 5 | 54 | 8.09518 | .0025 ** |
| Ambiente | QMA/QMR | 2. | 54. | 40.75886 | .0 ** |
| Trat x Amb | QMGA/QMR | 10 | 54 | 5.31692 | .00251 ** |

Figura 6.2 - Anova da variável comprimento de hipocótilo de plântulas de trigo com extratos aquosos de materiais incubados por diferentes períodos

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====> Comprimento de radícula de trigo

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|----------------------------------|-----------|----------|
| TRATAMENTOS | 5 | 249.43365 | 49.88673 | 8.32899 |
| AMBIENTES | 2 | 466.83167 | 233.41583 | 38.97064 |
| TRATxAMB | 10 | 325.32636 | 32.53264 | 5.43158 |
| RESÍDUO | 54 | 323.43467 | 5.98953 | |
| TOTAL | 71 | 1365.02634 | | |
| MÉDIA | | 14.97535270463888888888888888889 | | |
| CV(%) | | 16.342531950658685328845561366 | | |

Teste de Hipótese

| FV | TESTE | GL NUM | GL DEN | F | PROBABILIDADE (%) |
|------------|----------|--------|--------|----------|-------------------|
| Tratamento | QMG/QMR | 5 | 54 | 8.32899 | .00225 ** |
| Ambiente | QMA/QMR | 2. | 54. | 38.97064 | .0 ** |
| Trat x Amb | QMGA/QMR | 10 | 54 | 5.43158 | .0016 ** |

Anexo 06 – Imagens de alguns dos procedimentos metodológicos empregados.



Amostragem de parte aérea de capim-annoni-2. Fazenda Pacheco, Abelardo Luz (SC). Fonte: do autor, 2015.



Amostragem de solo. Fazenda Pacheco, Abelardo Luz (SC). Fonte: do autor, 2015.



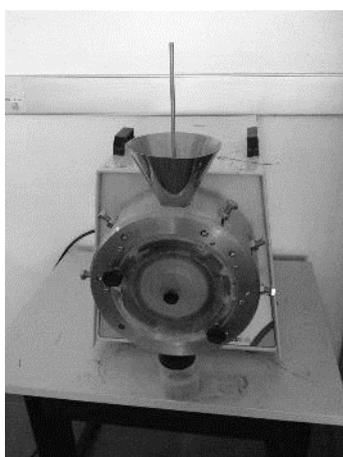
Estratificação da amostra de solo. Fazenda Pacheco, Abelardo Luz (SC). Fonte: do autor, 2015.



Preparação da parte aérea de capim-annoni-2 para secagem. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Estufa com circulação de ar forçada microprocessada, modelo 400 marca Ethiktechnology para secagem de parte aérea de capim-annoni-2 e solo. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Moinho tipo facas utilizado para trituração de parte aérea de capim-annoni-2 e solo. Laboratório de Solos da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



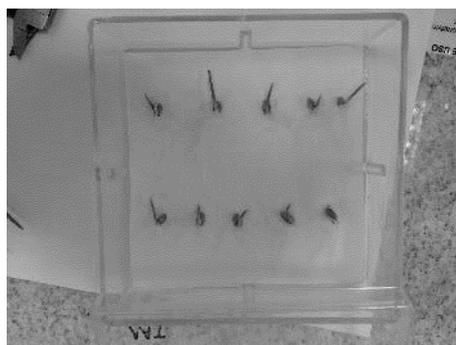
Funil de cerâmica com papel filtro e erlenmeyer tipo Kitasato utilizado na filtragem dos extratos com vácuo. Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Centrifuga modelo 3-16KL marca Sigma® utilizada nos processos de centrifugação dos extratos. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Evaporador rotativo utilizado para remoção de solvente em vácuo. Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Gerbox utilizada para os ensaios de germinação e fitotoxicidade. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Frascos de vidro utilizados na simulação da degradação. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



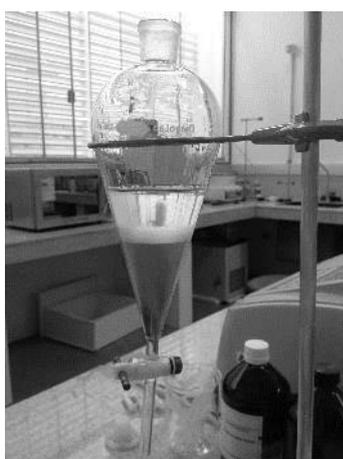
Agitador orbital incubadora tipo "shaker" modelo Star FT 38 marca Fortinox utilizado nos processos de extração. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2016.



Filtragem em papel filtro do extrato aquoso do material degradado. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Extratos aquosos do material degradado armazenados em refrigerador. Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Funil de separação utilizado nas extrações líquido-líquido dos extratos de material degradado. Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Espectrofotômetro modelo 1600UV marca Nova utilizado para quantificação de fenóis totais. Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul (PR). Fonte: do autor, 2015.



Cromatógrafo líquido modelo 920-R6 marca Varian® utilizado para identificação e quantificação de compostos nas amostras. Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* de Pato Branco (PR). Fonte: do autor, 2016.