

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DE *Memora peregrina* – “CIGANINHA” – BIGNONIACEAE, UMA ESPÉCIE INVASORA DE PASTAGENS EM MATO GROSSO DO SUL

Rafaela Ferreira Grassi

Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande - MS

Ubirazilda Maria Resende

Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande - MS

Walciane da Silva e Maria Lígia Rodrigues Macedo

Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 210, 79603-011 Três Lagoas - MS

Ana Paola Butera, Elayne de Oliveira Tulli, Francis Paes Saffran e João Máximo de Siqueira*

Departamento de Farmácia-Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande - MS

Recebido em 15/12/03; aceito em 20/9/04; publicado na web em 28/1/05

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ALLELOPATHY IN *Memora peregrina*, ‘CIGANINHA’, BIGNONIACEAE, AN INVADING SPECIES IN PASTURES IN MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL. *Memora peregrina* (local name: ‘ciganinha’ – Bignoniaceae) is a weed that often invades pastures in the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. From its leaves and subterranean parts, the following compounds were isolated: allantoin (20.7 w/w in subterranean parts), the iridoid 6 β -hydroxyipolamiide, hyperin, 3'-O-methylhyperin, 4-hydroxy-N-methylproline, β -sitosterol, α -amirin and β -amirin, and lupeol. Allantoin exhibited an activity of inducing germination in seeds of *Lactuca sativa* used as a biological model, and the iridoid showed moderate activity in the larval development of *Anagasta kuehniella*. These results, associated with this plant's behavior, are suggestive of the occurrence of adaptive and competitive strategies in relation to other plant species.

Keywords: *Memora peregrina*; Bignoniaceae; invading plants.

INTRODUÇÃO

Plantas invasoras são espécies vegetais, tanto silvestres quanto exóticas, que nascem e se reproduzem espontaneamente, comportando-se de forma indesejável e, geralmente, em áreas de grande interesse econômico, sem que seu cultivo seja de interesse¹.

Várias características biológicas estão envolvidas na definição e classificação de espécies vegetais invasoras. O potencial de invasão de algumas espécies já foi avaliado, levando em conta suas características biológicas (períodos de floração, alturas de caule, hábitos, tipos de flores e limites geográficos) e fazendo uso de cálculos estatísticos, com o intuito de classificá-las como tal². Interações ecológicas, efeitos alelopáticos e crescimento acelerado também já foram considerados. As interações alelopáticas, em particular, podem constituir um dos fatores decisivos para o sucesso da invasão³. As espécies invasoras são oportunistas e, por sua fácil disseminação e germinação, rápido crescimento inicial e alto crescimento morfológico e fisiológico⁴, adaptam-se facilmente aos distúrbios antropogênicos. A classificação de uma espécie como invasora pode advir do conjunto dos fatores acima apontados, bem como de outros ainda não elucidados.

Dentre as espécies da família Bignoniaceae classificadas como invasoras e cuja constituição química já foi investigada, podemos citar¹ *Amphilophium paniculatum* (“cipó-de-água”), *Arrabidaea brachypoda*⁵ (“cipó-una”), *Arrabidaea florida* (“cipó-neve”), *Macfadyena unguis-cati*⁶ (“unha-de-gato”), *Pyrostegia venusta*⁷

(“erva-de-são-joão”), *Tecoma stans*⁸ (“amarelinho”) e *Sparattosperma leucanthum* (“tarumã”). Muitas delas são típicas do cerrado e outras podem ser encontradas em florestas semidecíduas¹. Todas elas são plantas nativas do Brasil, com exceção da *T. stans*, que é nativa da América Central.

As bignoniáceas invasoras são cultivadas há muito tempo como plantas ornamentais, mas, em decorrência dos efeitos antropogênicos sobre a natureza, adquiriram certa eficiência para sobreviver¹.

O gênero *Memora* (sin. *Pleonotoma*) dessa família é constituído por 72 espécies⁹. A espécie *M. peregrina* (Miers) Sandwith é nativa do Brasil, sendo muito freqüente no cerrado¹. Essa planta vem infestando grandes áreas, que foram transformadas em pastagens no Centro-Oeste brasileiro. Por trazer sérios prejuízos à economia dessa região, sua propagação e os métodos para sua erradicação e controle têm sido objetos de interesse¹⁰.

O presente artigo descreve a investigação química e a avaliação da atividade alelopática de *M. peregrina*, Bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em Mato Grosso do Sul. Tanto a ausência de estudos químicos sobre esse gênero¹¹ quanto de investigações sobre seu impacto econômico motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, que visou não somente contribuir com dados químicos e da atividade biológica dessa espécie, mas também auxiliar a elucidar o mecanismo que a leva a ser classificada como invasora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos das folhas e partes subterrâneas (súber e lenho) foram avaliados sob o ponto de vista fitoquímico e de atividade biológica, como descrito a seguir.

*e-mail: jmaximo@nin.ufms.br

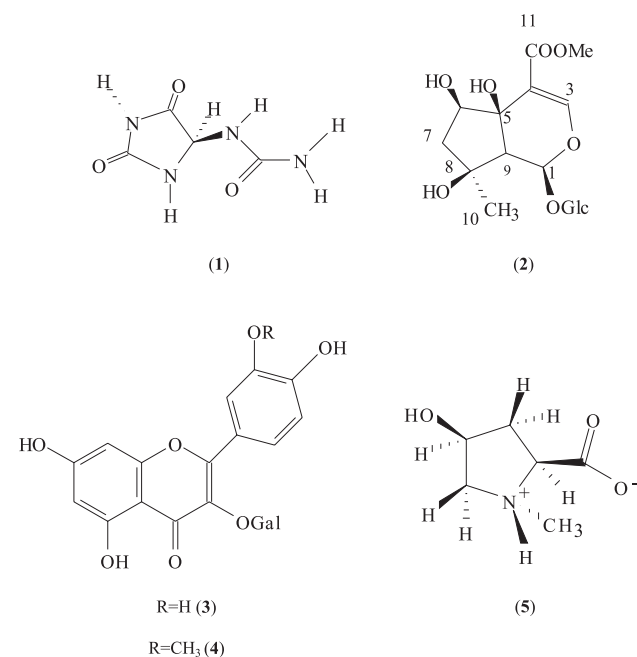
A substância **1**, embora sendo produto majoritário nos diferentes extratos e frações obtidos dos órgãos subterrâneos, é encontrada em pequena quantidade nas folhas. Essa substância apresentou-se como um sólido amarelo-claro, com aspecto de lâminas, insolúvel em clorofórmio, solúvel em DMSO, MeOH e H₂O. Pelos dados de RMN ¹H e de ¹³C, pôde-se confirmar que se tratava de alantoína⁷.

A substância **2**, predominante no extrato de acetato de etila das folhas, apresentou-se como um sólido branco cristalino, insolúvel em clorofórmio, pouco solúvel em MeOH e solúvel em H₂O e DMSO. Dessa substância foram obtidos os dados espectrais de RMN, IV, [α]_D e EM-IES. Os dados de RMN ¹³C/DEPT 135° permitiram constatar a presença de dois sinais de carbonos metilênicos, dois de carbonos metílicos e de nove metínicos (sendo um deles olefínico) e quatro de carbonos não-hidrogenados, sendo um relacionado a uma dupla, sugerindo um monoterpreno bicíclico glicosilado. Por comparação com os dados encontrados na literatura¹², pôde-se confirmar tratar-se de 6β-hidroxiipolamiida, um iridóide glicosilado isolado anteriormente de *Stachytarpheta mutabilis* (Verbenaceae). Esse iridóide, até onde é de nosso conhecimento, não foi anteriormente isolado de Bignoniaceae¹³.

A substância **3** é um sólido amarelo. Por meio de dados espectrais de UV, RNM ¹H e RMN ¹³C, pôde ser confirmada como hiperina, a partir da comparação com o descrito na literatura¹⁴.

A substância **4** apresentou dados espectrais bastante similares aos de **3**, mas com a presença de um sinal adicional referente a uma metoxila nos espectros de RMN ¹H e de ¹³C (δ_H = 3,83 e δ_C = 56,02), o que nos permitiu concluir tratar-se do derivado 3'-O-metil de **3**¹⁵.

A substância **5** foi obtida tanto das folhas quanto dos órgãos subterrâneos, mas em pequena quantidade. Apresentou-se como um sólido amorfo, solúvel em MeOH e H₂O. Por comparação de seus dados de RMN ¹H e RMN ¹³C com os descritos na literatura, pôde-se confirmar que se tratava de 4-hidróxi-*N*-metilprolina¹⁶.



O papel ecológico de alguns metabólitos isolados de *M. peregrina* tem sido discutido. Um exemplo é a classe dos iridóides, que apresenta importância ecológica por inibir a alimentação ou diminuir a taxa de crescimento de muitos insetos herbívoros generalistas¹⁷. No presente trabalho foi avaliado o potencial inibitório de **2** sobre o desenvolvimento larval de *Anagasta kuehniella*, um inseto da ordem Lepidoptera, família Pyralidae. Esse inseto, por ser altamente

generalista e um dos principais predadores de produtos armazenados, pode ser utilizado como modelo para a compreensão do papel desempenhado por diferentes metabólitos na defesa de plantas.

Nossos resultados mostraram que **2** não tem eficácia na mortalidade larval de *A. kuehniella* (Figura 1). Entretanto, esse composto é capaz de reduzir em 30% o peso dessas larvas (Figura 2).

O decréscimo no peso larval não pôde ser atribuído à inibição da alimentação, uma vez que o iridóide, diferentemente da maioria dos outros metabólitos secundários¹⁸, estimulou o consumo da dieta oferecida em aproximadamente 24%. Entretanto, os insetos submetidos a esse tratamento tiveram uma redução de 19% na produção de fezes, indicando que, de alguma forma, a assimilação da dieta contendo o iridóide não foi satisfatória. O fato de **2** ter estimulado o consumo da dieta pelas larvas, provavelmente, significa que estas se depararam com um alimento de difícil digestão, o que as estimulou a fazer maior consumo desse alimento na tentativa de compensar a baixa assimilação dos nutrientes. Esse tipo de comportamento é comum em insetos¹⁹.

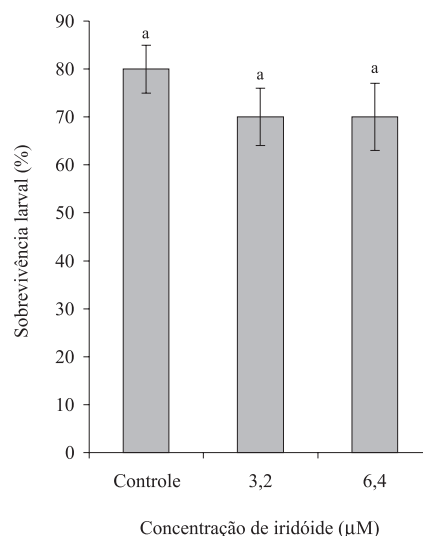


Figura 1. Sobrevivência das larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais. Letras iguais significa que não há diferença significativa nos tratamentos realizados ($n = 60$; $p < 0,05$, ANOVA)

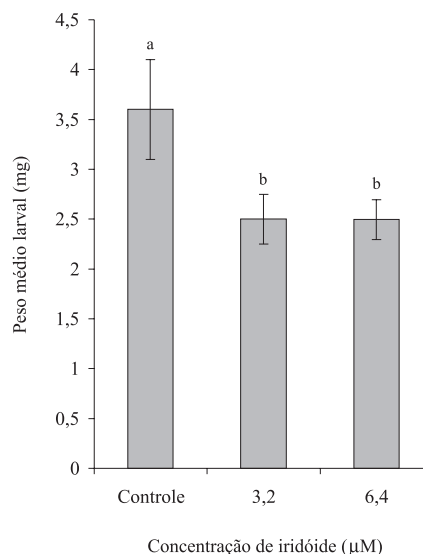


Figura 2. Peso médio das larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais. As letras diferentes mostram que as diferenças são significativas entre os tratamentos. ($n = 60$; $p < 0,05$)

Com relação a 4-hidróxi-*N*-metilprolina, o teor desta substância e alguns de seus análogos em tecidos celulares vegetais tem sido correlacionado ao estresse hídrico, podendo tais compostos estar envolvidos no mecanismo de ajuste osmótico²⁰.

Outro metabólito que despertou interesse foi a alantoína, encontrada em grande quantidade em *M. peregrina*, bem como em outra bignoniácea. Considerando-se essa espécie e as outras sete citadas anteriormente como invasoras, há descrições da presença de alantoína em três, sendo que em duas – *P. venusta* e *M. peregrina* – foram estudados os órgãos subterrâneos, nos quais se constatou que a proporção desse ureídeo é consideravelmente alta⁷. Em outra espécie é descrita a presença de alantoína nas partes aéreas.

Esse alto teor tem sido objeto de atenção⁷, pois o interesse farmacêutico pela alantoína enseja a substituição da fonte extrativista naturalmente utilizada – *Symphytum officinale* L., “confrei” – por qualquer uma das duas bignoniáceas – *P. venusta* ou *M. peregrina*.

Por outro lado, o alto teor desse ureídeo, associado ao comportamento de *M. peregrina* como invasora, sugere alguma relação com estratégias adaptativas e de competitividade com outras espécies. A forma de deslocamento do nitrogênio nas espécies vegetais – etapa final da fixação do nitrogênio – é importante para que esse elemento possa estar metabolicamente disponível para a planta. Esse transporte pode se dar através de diferentes substâncias: a glutamina e a asparagina são freqüentemente encontradas em espécies de clima temperado, enquanto os ureídeos são apontados como principal forma de reserva de nitrogênio em espécies tropicais²¹, destacando-se entre estes a alantoína e ácido alantóico²¹. Apesar de os ureídeos serem considerados compostos de síntese complexa, apresentam certas vantagens relacionadas ao menor custo energético, pois favorecem a economia de carbono para a planta, quando comparados com a asparagina e a glutamina. Os ureídeos são úteis e específicos no transporte de nitrogênio, levando-o aos órgãos de interesse na planta, onde são rapidamente metabolizados²².

Experimentos desenvolvidos com cultura de tecidos de *Glycine max* (L.) mostraram que a adição de glutamina e asparagina promove o desenvolvimento de raízes na região nodal, entre o hipocótilo e epicótilo. Esse efeito estimulante foi mais acentuado quando se adicionou alantoína ao meio²³.

No presente trabalho foi testado o possível efeito alelopático da alantoína sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*) – um modelo amplamente utilizado para esse tipo de experimento²⁴. Como mostra a Figura 3, a alantoína em baixas concentrações promoveu a indução de crescimento da radícula de *Lactuca sativa*.

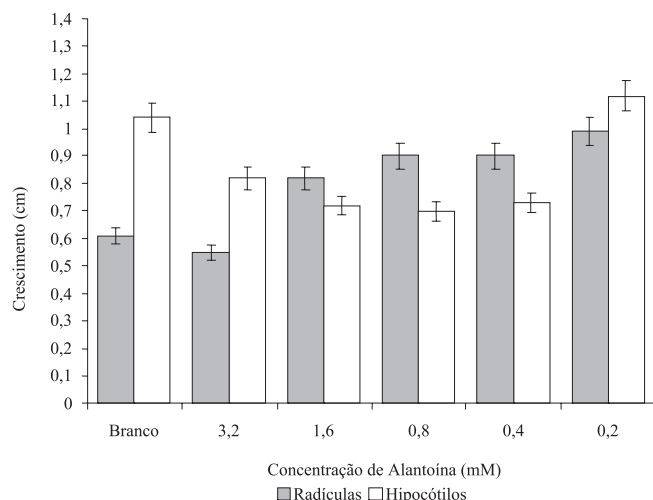


Figura 3. Efeito da alantoína sobre o desenvolvimento das radículas e hipocótilo de sementes de alface – *Lactuca sativa* ($n=750$; $p < 0,05$, ANOVA)

A evidência de que os ureídeos estão associados ao processo de transporte de nitrogênio – tornando esse elemento uma fonte mais disponível e economicamente viável para a divisão, o crescimento e a diferenciação celular do vegetal²² –, associada ao efeito organogênico²³ e indutor de germinação da radícula mostrado pela alantoína no presente trabalho, sugere uma forte correlação entre a presença dessa última substância em altas concentrações nos órgãos subterrâneos de *M. peregrina* e a alta capacidade de crescimento vegetativo e disseminação dessa espécie em ambientes modificados por ação antropogênica.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e material cromatográfico

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX-300, as amostras foram solubilizadas em $CDCl_3$, $DMSO-d_6$, D_2O e CD_3OD e o padrão interno consistiu no próprio solvente deuterado ou TMS. Nos espectros das substâncias que foram solubilizadas em D_2O , utilizou-se como padrão interno o dioxano. O espectro de massas de baixa resolução de **2** foi obtido em um equipamento QTOF Micromass, por ionização por eletrospray. Condições de IES(+): a amostra foi dissolvida em metanol:H₂O 1:1, acidificada com 0,2% de ácido fórmico e injetada em fluxo de 1,0 mL/min. Sílica 60 G 70-230 mesh (Merck) foi utilizada para a coluna cromatográfica; sílica gel 35-70 mesh (Fluka), para a coluna rápida; uma mistura de sílica gel 60 G (90%) e sílica gel 60 GF₂₅₄ (10%) foi usada para as placas preparativas. Também foram usadas placas preparativas impregnadas com $AgNO_3$, preparadas com a mistura descrita acima acrescida de $AgNO_3$, na proporção 80:10:10.

Material vegetal

O material vegetal (folhas e órgãos subterrâneos) foi coletado em março de 2000 em Terenos, MS. As amostras foram identificadas pela bióloga U. M. Resende, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sendo uma exsicata depositada no Herbarium CGMS, sob n.º 07947.

Extração

Obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila e hidrometanólico das folhas de M. peregrina

O pó das folhas secas (180 g) foi submetido à extração exaustiva em soxhlet por um período de 6 h para cada solvente, utilizando hexano, seguido de acetato de etila e, por último, metanol:H₂O 9:1, v/v. Os extratos hexânico e de acetato de etila foram submetidos à cromatografia em coluna.

Fracionamento do extrato hexânico obtido das folhas de M. peregrina

O extrato (3,5 g), de coloração verde-escura, apresentou-se muito viscoso, obtendo-se inicialmente, por precipitação, 3,98 mg de alantoína (**1**). O extrato foi submetido à coluna em sílica, com uma variação de gradiente de solvente DCM:MeOH. A fração F1-17 foi submetida novamente à cromatografia em coluna, seguida de cromatografia (DCM:Hex 1:1) preparativa de sílica impregnada com $AgNO_3$, sendo isolados três triterpenos esterificados (1 mg, 1,5 mg e 2,7 mg), os quais não foram totalmente caracterizados, embora por RMN ¹³C tenha sido possível verificar serem ésteres de 3-O-acil- β -sitosterol. A fração F65-69 foi também trabalhada em cromatografia preparativa impregnada ($CHCl_3$:AcOEt 9:1) por $AgNO_3$, da qual se pôde obter uma mistura de α -amirina e β -amirina (10,6 mg) e lupeol

puro (7,0 mg). Da fração F89, que foi purificada por cromatografia preparativa, foi possível obter-se β -sitosterol (5,7 mg).

Fracionamento do extrato de acetato de etila das folhas de *M. peregrina*

A fração acetato de etila (6 g) foi submetida a fracionamento em coluna de sílica (300 g) com gradiente de CHCl_3 :MeOH. Com esse procedimento foi possível isolar hiperina (**3**) (15,2 mg), seu derivado 3'-O-metil (**4**) (11,0 mg), alantoína (**1**) (45,0 mg) e um iridóide (**2**) (320,0 mg). Uma fração mais polar foi obtida (MeOH:CHCl₃ 95:5) (100 mg), a qual foi novamente submetida a fracionamento em coluna rápida (gradiente CHCl₃:MeOH), permitindo isolar 4-hidróxi-N-metilprolina (**5**) não totalmente pura (22,9 mg).

Obtenção e fracionamento do extrato hidrometanólico dos órgãos subterrâneos

O súber (200 g) foi submetido à extração exaustiva em Soxhlet utilizando metanol:água 9:1 por 6 h. O extrato apresentou-se na forma de um material pouco viscoso, de cor marrom-escura e com presença de um precipitado de cor clara. O extrato foi ressolubilizado (MeOH:H₂O, 9:1) e com acetona pôde-se separar do sobrenadante um precipitado: alantoína (**1**), totalizando 12,45 g (16,6%). O sobrenadante foi concentrado e perpez 61,9 g, sendo então solubilizado em MeOH:H₂O e submetido à partição em um sistema de solvente com polaridade crescente. As frações de CHCl₃ e de AcOEt (total de 9 g) mostraram o mesmo perfil cromatográfico e foram reunidas e submetidas a fracionamento em coluna, mas apresentando ainda como principal constituinte, na maioria dos casos, a substância **1**, seguida de **2** – esta última sendo obtida após recristalização (120 mg) – e pequena quantidade de **5**, embora em mistura. Na fração hidrometanólica também foram detectadas por CCD essas substâncias como principais constituintes.

Com o intuito de confirmar a presença de **1** como principal constituinte no órgão subterrâneo dessa espécie, outro extrato hidrometanólico foi obtido com a utilização do lenho e do súber subterrâneos. Após extração exaustiva e concentração, seguidas de precipitações sucessivas com acetona, pôde-se confirmar a presença de 20,7% de alantoína.

Alantoína (1): sólido cristalino amarelo-claro, aspecto de lâminas, Rf 0,40 (CHCl₃:MeOH, 1:1), coloração azul com sulfato cérico, solúvel em H₂O e DMSO. Seus dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C foram comparados com os descritos na literatura⁷.

6 β -hidroxipolamiida (2): sólido cristalino branco, Rf 0,52 (CHCl₃:MeOH, 1:1), coloração azul com sulfato cérico, PF 193-195 °C (lit. 192-194 °C)¹² e $[\alpha]_D^{25} -155,4^\circ$ (lit. $-161,0^\circ$)¹² (MeOH, c 0,2), IV ν_{\max} (KBr) cm⁻¹ 3450, 3407, 1705, 1647, 1065; EM-IES(+): m/z 405 [M- H₂O + H⁺]; RMN ¹H [300 MHz, D₂O, δ (ppm), multiplicidade] 7,46 (1H, sl, H-3), 5,72 (1H, sl, H-1), 4,66 (1H, dl, J = 8,0 Hz, H-1'), 4,03 (1H, ddl ou pseudo-t, J_{6-7 β} = 8,0 Hz e J_{6-7 β} = 6,1 Hz, H-6), 3,79 (1H, dl, J = 11,7, H-6'a), 3,61 (1H, sinal coberto, H-glicose), 3,61 (3H, s, H-12), 3,40-3,13 (4H, m, H-glicose), 2,47 (1H, s, H-9), 1,97 (1H, dd, J_{7 β -7 α} = 13,0 Hz, J_{7 β -6} = 6,1 Hz, H-7 β), 1,75 (1H, dd, J_{7 α -7 β} = 13,0 Hz, J_{7 α -6} = 8,0 Hz, H-7 α), 1,02 (3H, s, H-10); RMN ¹³C (75MHz, D₂O, padrão interno dioxano) 22,9 (C-10), 46,4 (C-7), 52,1 (OCH₃), 58,4 (C-9), 60,9 (C-6'), 70,7(C-4'), 70,4 (C-5), 72,6 (C-2'), 73,8 (C-6), 74,1 (C-8), 75,6 (C-3'), 76,5 (C-5'), 93,5 (C-1), 98,6 (C-1'), 112,1 (C-4), 153,8 (C-3), 168,3 (C-11).

Hiperina (3) e 3'-O-metil-hiperina (4): sólido amarelo amorfo, Rf 0,65 e 0,70, respectivamente (AcOEt:MeOH:H₂O, 100:13,5:10), mancha amarela fluorescente sob UV após borrifação com sulfato cérico. Os dados de UV, RMN ¹H e ¹³C de (**3**)¹⁴ e os de RMN ¹³C de (**4**)¹⁵ foram comparados com os obtidos da literatura.

4-hidróxi-N-metilprolina (5): sólido amorfo, obtido não total-

mente puro. $[\alpha]_D^{25} = -58,9^\circ$ (lit. $-82,7^\circ$)¹⁶ (H₂O, c 0,05). Os dados de RMN de ¹H e ¹³C estão de acordo com os descritos na literatura¹⁶.

α -amirina, β -amirina e lupeol: inicialmente obtidos como mistura, com aspecto de sólido branco. Rf 0,45 (DCM: Hx, 1:1), apresentando mancha roxa com vanilina/ácido sulfúrico. A mistura de α -amirina e β -amirina foi separada do lupeol por CCD preparativa impregnada com AgNO₃, utilizando o mesmo eluente. Seus dados RMN ¹³C foram comparados com os descritos na literatura²⁵.

β -sitosterol: sólido branco amorfo, Rf 0,40 (CHCl₃:MeOH, 90:10), mancha marrom quando revelado com vanilina/ácido sulfúrico. Os dados de RMN ¹³C foram comparados com os descritos na literatura²⁶.

Ensaios biológicos

Anagasta kuehniella

Os lepidópteros foram obtidos de colônias providas do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas – Departamento de Ciências Naturais, Centro Universitário de Três Lagoas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Criação de insetos

Os insetos foram mantidos em uma sala de criação em temperatura relativa de 27 \pm 1 °C e umidade relativa de 65-70%. A dieta artificial consistiu numa mistura de trigo integral, gérmen de trigo, farelo de trigo e levedura (8:2:1,9:0,1). A cada geração foi efetuada infestação de novas colônias com ovos de um dia de oviposição²⁷.

Preparação da dieta artificial como forma de alimentação para *A. kuehniella*

A dieta consistiu em mistura de farinha de trigo, gérmen de trigo, farelo de trigo e levedura (8:2:1,9:0,1) acrescida de **2**. As incorporações foram realizadas nas concentrações de 0 (controle), 3,2 μ M e 6,4 μ M. Foram preparadas 15 dietas, sendo colocadas 4 larvas neonatas em cada uma (n = 60). Os experimentos foram analisados após 24 dias, verificando-se o peso médio e o número de sobreviventes de *A. kuehniella*. Também se analisaram as quantidades de dieta consumida e de fezes produzidas por cada larva. Essas larvas de 4.º instar também foram analisadas quanto ao consumo da dieta e produção de fezes em relação aos controles e ao tratamento com **2**.

Ensaio de indução de germinação e crescimento de radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*

Esse ensaio biológico consistiu no acompanhamento da germinação, com temperatura controlada entre 27-29 °C. O desenvolvimento das radículas e hipocótilos de sementes de alface²⁴ (*Lactuca sativa*, semente comercial Grand Rapids, origem chilena, 99% de germinação) foi feito em placas de Petri, contendo discos de papel de filtro com soluções de extratos ou substâncias a serem testados e o branco. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e, no mínimo, em três concentrações. As placas de Petri com soluções-testes, branco e controle positivo receberam o mesmo número de sementes (25). O teste envolvendo a avaliação da alantoína foi repetido duas vezes, sendo em cada vez desenvolvido em triplicata.

Para melhor ajuste da osmolaridade, de maneira que essa não interferisse no resultado²⁸, o teste foi feito em solução tampão:H₂O, 80:20, em metodologia desenvolvida e proposta pela primeira vez no presente trabalho. A solução foi preparada da seguinte maneira: solução A, 27,6 g de NaH₂PO₄ \times H₂O (0,2 M) diluídos em 1 L de água destilada; solução B, 53,65 g de NaH₂PO₄ \times 7H₂O (0,2 M) diluídos em 1 L de água destilada recém-fervida. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,2 misturando-se 438,5 mL de solução A, 61,5 mL de solução B e 500 mL de água destilada. Basicamente, o teste

consistiu no acompanhamento do índice de germinação²⁸ ao longo de cinco dias seguidos, fazendo-se, após esse período, a medição das radículas e hipocótilo separadamente. Os valores observados para diferentes concentrações foram comparados com o branco e avaliados estatisticamente segundo análise de variância e desvio-padrão.

Análise estatística

A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para múltiplas comparações. Fixou-se $p < 0,05$ para indicar significância estatística.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. M. R. Marques e ao Prof. Dr. W. S. Garcez, pelas discussões enriquecedoras ao longo desse trabalho. A S. G. Nunes e A. C. Barbosa, pelo auxílio nas coletas botânicas. Em especial, a S. G. Nunes, por informações importantes para a discussão do trabalho. A J. R. Fabri, pelo apoio técnico. Ao CNPq, pela bolsa de Mestrado; ao CNPq/FUNDECT, pela bolsa de Apoio Técnico; ao programa PIBIC/CNPq/UFMS, pelas bolsas de Iniciação Científica. À FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul) pelo apoio financeiro desse projeto.

REFERÊNCIAS

- Lorenzi, H.; *Plantas Daninhas do Brasil*, 3ª ed., Plantarum: Nova Odessa, 2000.
- Goodwin, B. J.; McAllister, A. J.; Fahrig, L.; *Cons. Biol.* **1999**, *13*, 422.
- Goslee, S. C.; Peters, D. P. C.; Beck, K. G.; *Ecol. Model.* **2001**, *139*, 31.
- Dietz, H.; Steilein, T.; Ullmann, I.; *Acta Oecol.* **1999**, *20*, 621.
- Alcerito, T.; Barbo, F. E.; Negri, G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 677.
- Duarte, D. S.; Dolabela, M. F.; Salas, C. E.; Raslan, D. S.; *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 347.
- Ferreira, D. T.; Álvares, P. S. M.; Houghton, P. J.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 42.
- Bianco, A.; Massa, M.; Oguakwa, J. U.; Passacantili, P.; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1871; Kunapuli, S. P.; Vaidyanathan, C. S.; *Plant Sci.* **1982**, *24*, 183; Kunapuli, S. P.; Vaidyanathan, C. S.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1826; Lins, A. P.; Felicio, J. D.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 876.
- <http://www.mobot.org>, acessada em Setembro 2003.
- <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD35.html>, acessada em Setembro 2003.
- <http://isi3.isiknowledge.com/portal.cgi>, via portal periódicos capes, <http://www.periodicos.capes.gov.br/>, acessada em Setembro 2003.
- De Luca, C.; Guiso, M.; Martino, C.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1185; Potterat, O.; Msonthi, J. D.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2677.
- Von Poser, G. L.; Schripsema, J.; Henriques, A. T.; Jensen, S. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 351.
- Mendez, J.; Bilia, A. R.; Morelli, I.; *Pharm. Acta Helv.* **1995**, *70*, 223.
- Agrawal, P. K.; Bansal, M. C. Em *Carbon-13 NMR of Flavonoids*; Agrawal, P. K., ed.; 3ª ed.; Elsevier: Amsterdam, 1989, cap. 6.
- Shuto, S.; Chillemi, R.; Piatelli, M.; Impellizzeri, G.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2311.
- Darrow, K.; Bowers, M. D.; *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1427; Nieminen, M.; Suomi, J.; Van Nouhuys, S.; Sauri, P.; Riekkola, M.-L.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 823.
- Marchini, L. C.; *Entomologia Agrícola*, FEALQ: Piracicaba, 2002, cap. X.
- Fitches, E.; Gatehouse, J. A.; *J. Insect Physiol.* **1998**, *44*, 1213.
- Jones, G. P.; Naidu, B. P.; Paleg, L. G.; Tienkik, E. R. T.; Snow, M. R.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3343; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Farias, J. R. B.; Oya, T.; *Biot. Cien. Desenv.* **2001**, *23*, 12.
- Hopkins, W. G.; *Introduction to Plant Physiology*, Willey: London, 1995, cap. 6.
- Thomas, R.; Schrader, L. E.; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 361.
- Shetty, K.; Asano, Y.; Oosawa, K.; *Plant Sci.* **1992**, *81*, 245.
- Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2512.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
- Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
- Macedo, M. L. R.; Damico, D. C. S.; Freire, M. G. M.; Toyama, M. H.; Marangoni, S.; Novello, J. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2980.
- Haugland, E.; Brandsaeter, L. O.; *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22*, 1845.