

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

BRUNO REIS

Efeitos de terpenoides sobre a germinação, crescimento inicial, fotossíntese, fluorescência e microscopia de *Glycine max*, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*

Maringá

2015

BRUNO REIS

Efeitos de terpenoides sobre a germinação, crescimento inicial, fotossíntese, fluorescência e microscopia de *Glycine max*, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Reis, Bruno  
R375e Efeitos de terpenoides sobre a germinação,  
crescimento inicial, fotossíntese, fluorescência e  
microscopia de *Glycine Max*, *Ipomoea grandifolia* e  
*Euphorbia heterophylla* / Bruno Reis. -  
Maringá, 2015.  
120 f.; Il. Graf.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrares Filho.  
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato

Tese (Doutorado em Agronomia) -  
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-  
graduação em Agronomia.

1. Alelopatia. 2. Fisiologia vegetal.  
3. Fotossíntese. 4. Germinação. 5. Crescimento.  
6. Bioherbicida. 7. Monoterpeno. 8. Citronelol.  
9. Citronelal. 10. Geraniol. 11. Mitochondrias -  
Microscopia. I. Ferrase Filho, Osvaldo, orient.  
II. Bonato, Carlos Moacir, coorientador. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-  
graduação em Agronomia. III. Título.

BRUNO REIS

**EFEITOS DE TERPENOIDES SOBRE A GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO INICIAL, FOTOSSÍNTESE, FLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA DE *Glycine max*, *Ipomoea grandifolia* E *Euphorbia heterophylla***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção de Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. **Oswaldo Ferrarese Filho**  
Presidente



---

Prof. Dr. **Carlos Moacir Bonato**  
Membro



---

Prof. Dr. **Werner Camargos Antunes**  
Membro



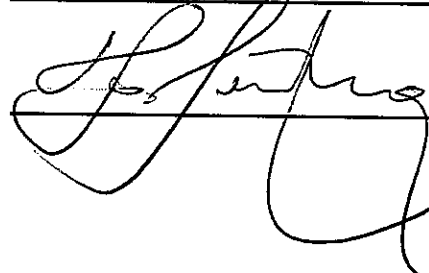
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Lindamir Hernandez Pastorini**  
Membro



---

Prof. Dr. **Mauricio Ursi Ventura**  
Membro



---

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências.....	5
CAPÍTULO 1 .....	8
Efeito do óleo essencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> na germinação e crescimento de plântulas de <i>Glycine max</i> , <i>Ipomoea grandifolia</i> e <i>Euphorbia heterophylla</i> .....	8
Abstract.....	9
Resumo .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1. <i>Glycine max</i> L. Merril.....	13
2.2. <i>Euphorbia heterophylla</i> L. ....	13
2.3. <i>Ipomoea grandifolia</i> .....	15
2.4 <i>Eucalyptus cinerea</i> .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1. Material biológico.....	16
3.2. Local dos experimentos.....	17
3.3. Método geral de germinação .....	17
3.4. Determinação das variáveis de germinação .....	17
3.5. Análise do óleo essencial de <i>E. cinerea</i> . ....	19
3.6. Delineamento estatístico .....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1. Composição do óleo essencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> . ....	21
4.2. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação .....	21
4.3. Efeito do óleo essencial sobre as variáveis de crescimento .....	26
5. CONCLUSÕES.....	38

6. Referências.....	39
CAPÍTULO 2.....	44
Efeito dos monoterpenos citrionelol, citrionelal e geraniol sobre a germinação e crescimento inicial de <i>Euphorbia heterophylla</i> L .....	44
Abstract.....	45
Resumo .....	46
1. INTRODUÇÃO .....	48
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
3.1. Material biológico e reagentes.....	51
3.2. Local dos experimentos.....	51
3.3. Método de germinação.....	51
3.4. Determinação das variáveis de germinação .....	52
3.5. Experimento de crescimento .....	53
3.6. Experimentos de avaliação do efeito herbicida dos terpenoides em pós emergência inicial. ....	54
3.7. Análise do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> . ....	54
3.8. Delineamento estatístico .....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
4.1. Composição do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	56
4.2. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação .....	57
4.3. Comparação das DL <sub>50</sub> sobre variáveis de germinação.....	67
4.4. Efeito dos monoterpenos no crescimento de <i>E. heterophylla</i> . ....	70
4.5. Efeito dos monoterpenos no controle pós-emergência inicial de <i>E. heterophylla</i> em vaso.....	77
5. CONCLUSÕES.....	81
Referências.....	81
CAPÍTULO 3.....	88

Efeito dos monoterpenos citronelol, citronelal e geraniol sobre as variáveis de trocas gasosas, fluorescência, viabilidade celular e mitocôndria de <i>Euphorbia heterophylla</i> L.....	88
Abstract.....	89
Resumo .....	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	93
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	96
3.1. Condução do experimento em vasos.....	96
3.2. Análise das variáveis de trocas gasosas .....	96
3.3. Determinação da fluorescência da clorofila a e fluorescência durante a fotossíntese .....	96
3.4. Microscopia de fluorescência .....	97
3.4.1. Germinação e tratamentos .....	97
3.4.2. Microscopia e fotografia .....	97
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão .....	98
3.5.1. Embocamento .....	98
3.5.2. Obtenção das imagens (MET) .....	98
3.6. Análise estatística .....	99
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	99
4.1. Efeitos dos monoterpenos sobre as trocas gasosas em plantas adultas de <i>E. heterophylla</i> .....	99
4.2. Efeitos dos monoterpenos sobre as variáveis de fluorescência em plantas adultas de <i>E. heterophylla</i> .....	102
4.3. Experimento de fluorescência (viabilidade celular) .....	107
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	109
5. CONCLUSÕES.....	111
6. REFERÊNCIAS .....	112

Efeitos de terpenoides sobre a germinação e crescimento inicial de  
*Glycine max* L. Merrill, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*

**RESUMO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade bioherbicida dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, e *Eucalyptus cinerea*, citronelal, geraniol e citronelol sobre a germinação, crescimento, biomassa, trocas gasosas, microscopia e controle pós-emergência inicial de *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia*, e *Glycine max*. As sementes foram dispostas em placa de Petri e em vasos e, então, submetidas à diferentes concentrações dos óleos essenciais, citronelal, geraniol e citronelol e suas misturas (0 a 6%, com 1,5 ou 2% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (v/v). As placas foram acondicionadas em câmara BOD (Demanda biológica de oxigênio) a 25°C por 7 dias e fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos com vasos foram conduzidos em casa de vegetação. Para a avaliação das trocas gasosas e fluorescência, as duas plantas de *E. heterophylla* em vasos (1,5L) foram pulverizadas com 10 mL por vaso dos seguintes tratamentos: citronelal, citronelol e geraniol nas concentrações de 0,1 a 0,6% (v/v) e água e DMSO (2%, v/v) utilizados como controles. Os terpenos foram diluídos em DMSO 2% (v/v). Para os experimentos de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (MET) cinquenta sementes foram dispostas em placas de Petri contendo 10 mL dos seguintes tratamentos: controle constituído de DMSO 20000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , citronelal 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , citronelol 350  $\mu\text{L L}^{-1}$ , geraniol 450  $\mu\text{L L}^{-1}$ , óleo essencial de citronela 1800  $\mu\text{L L}^{-1}$  e óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* 4400  $\mu\text{L L}^{-1}$ . As placas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12h e temperatura ajustada à 25°C. Foram determinadas as seguintes variáveis: DL<sub>50</sub> (dose letal média), porcentagem de germinação (PGER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), massa seca total (MST), conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR), conteúdo de água total (CAT), porcentagem de plantas vivas (%PVIVAS), porcentagem de controle (%CONTROLE), porcentagem de plantas viáveis (%PVIÁVEIS), assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci),



assimilação instantânea de CO<sub>2</sub> (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/g<sub>s</sub>), eficiência do uso da água (A/E), relação transpiração/condutância estomática (E/g<sub>s</sub>), fluorescência mínima (F<sub>o</sub>), fluorescência máxima (F<sub>m</sub>), eficiência quântica potencial do fotossistema II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), fluorescência mínima em estado adaptado a luz (F<sub>o</sub>'), fluorescência máxima em estado adaptado a luz (F<sub>m</sub>'), eficiência quântica efetiva do FSII (Yield). Os dados foram submetidos a ANOVA e as variáveis quantitativas analisadas por regressão polinomial e teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as variáveis foram afetadas significativamente com o aumento da dose dos tratamentos. As variáveis de germinação foram afetadas com o incremento das doses, assim como as variáveis biométricas. Observou-se efeito antagônico entre o citronelal e o geraniol em mistura sobre as variáveis germinativas. Os acúmulos de biomassas frescas e secas foram reduzidos com o aumento das doses dos tratamentos. Em nível de casa de vegetação e aplicação por pulverização em pós-emergência inicial, o incremento da dose de citronelol causou clorose e necrose foliar em *E. heterophylla*, afetando significativamente a %PVIVAS, %PVIAVEIS e %CONTROLE. De maneira geral, os terpenos afetaram significativamente todas as variáveis avaliadas, inibindo a germinação, crescimento e acúmulo de biomassa das plantas daninhas em pós-emergência em vaso, variáveis de trocas gasosas, reduzindo drasticamente a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, fluorescência e indicando danos celulares e alterações mitocondriais. Assim, os óleos essenciais de *C. winterianus* e *E. cinerea* e os monoterpenos citronelal, geraniol e citronelol possuem grande potencial para serem utilizados como bioherbicidas. Entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados, em nível metabólico e em nível de campo para que conclusões definitivas possam ser obtidas.

**Palavras-chave:** Óleo essencial. Citronelal. Citronelol. Geraniol. *Cymbopogon winterianus*. *Eucalyptus cinerea*. Alelopatia. Bioherbicida.

## ABSTRACT

The goal of this study was to verify the bioherbicide activity of *Cymbopogon winterianus* essential oil, *Eucalyptus cinerea* essential oil, citronellal, geraniol and citronellol on germination, growth, biomass and early post-emergence of *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* control, and *Glicine max*. The seeds were placed in petri dishes and pots and submitted to different concentrations of *C. winterianus* essential oil, *E. cinerea* essential oil, citronellol, geraniol and citronellal, and mixtures thereof (0 to 6%, 1.5 to 2% DMSO v/v). The petri dishes were placed in BOD at 25°C for 7 days and 12 hours photoperiod. The experiments in vases were conducted in greenhouse. For the evaluation of the gaseous exchange and fluorescence, two plants of *E. heterophylla* in pots (1.5 L) were sprayed with 10 mL per pot of the following treatments: citronellal, citronellol and geraniol in concentrations from 0.1 to 0.6% (v/v) and water and DMSO (2% v/v) used as controls. The terpenes were diluted in 2% DMSO (v/v). For the experiments fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM) fifty seeds were placed in Petri dishes containing 10 mL of following treatments: control consisting of DMSO 20000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , citronellal 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , citronellol 350  $\mu\text{L L}^{-1}$ , geraniol 450  $\mu\text{L L}^{-1}$ , essential oil of citronella 1800  $\mu\text{L L}^{-1}$  and essential oil of *Eucalyptus cinerea* 4400  $\mu\text{L L}^{-1}$ . The plates were placed in BOD germination chamber with photoperiod of 12 hours and temperature set to 25°C. We determined the following variables: DL<sub>50</sub> (median lethal dose), germination percentage (PGER), average germination time (VMV), average germination speed (VMG), germination speed index (IVG), shoot length (CPA), root system length (CSR), total length (CT), ratio of shoot length/root length (RPA/SR), shoot fresh mass (MFPA), root fresh mass (MFSR), total fresh mass (MFT), shoot dry mass (MSPA), root dry mass (MSSR), total dry mass (TDM), water content of the shoot (CAPA), water content of the root (CAR), content Total water (CAT), percentage of live plants (PVIVAS%), percentage of control (CONTROL%), percentage of viable plants (% PVIIVEIS), CO<sub>2</sub> net assimilation (A), stomatal conductance (gs), transpiration (E) and intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci), instantaneous CO<sub>2</sub> assimilation (A/C), intrinsic efficiency of water use (A/g<sub>s</sub>), water use efficiency (A/E) ratio sweating/stomatal conductance (E/g<sub>s</sub>), minimal fluorescence (Fo), maximal fluorescence (Fm), potential quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm), minimum fluorescence in a state adapted to light (Fo'), maximum fluorescence in a state adapted to light (Fm'), effective quantum efficiency of PSII (Yield). Data were submitted to ANOVA and quantitative variables analyzed by polynomial regression and Scott-Knott test at 5% probability. All

variables were significantly affected with increasing treatments doses. Variables were affected germination with increasing doses of the treatments as well as biometric variables. Observed antagonistic effect between citronellal and geraniol in mixture over the germination variables. The accumulation of fresh and dry biomass was reduced with increasing doses of the treatments. In greenhouse the treatments were sprayed in early post-emergence, dose escalation of citronellol caused leaf chlorosis and necrosis in *E. heterophylla*, significantly affecting %PVIVAS, %PVIAVEIS and %CONTROL. In general, terpenes significantly affected all variables, inhibiting the germination, growth and biomass accumulation of weeds in post-emergence in pot, gas exchange variables, drastically reducing CO<sub>2</sub> net assimilation, fluorescence and indicating cell damage and mitochondrial changes. Thus, the *C. winterianus* essential oil, *E. cinerea* essential oil and the monoterpenes citronellal, geraniol and citronellol have great potential to be used as bioherbicide. However, there is need for more detailed in metabolic level and field level so that definitive conclusions can be obtained from studies.

**Keywords:** Essential oil. Citronellal. Citronellol. Geraniol. *Cymbopogon winterianus*. *Eucalyptus cinerea*. Allelopathy. Bioherbicide.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* avaliado por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)..... 21

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* avaliado por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)..... 56

Tabela 2: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas sobre a porcentagem de germinação (PGER) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)..... 68

Tabela 3: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)..... 69

Tabela 4: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas a velocidade média de germinação (VMG) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)..... 70

## INTRODUÇÃO GERAL

Desde tempos remotos, sabe-se que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento de outras que se encontram nas proximidades. Por muito tempo, esse fato foi tido como inexplicável (GOLDFARB *ET AL.*, 2009). Atualmente, sabe-se que as plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que aparentam não ter função direta no crescimento e desenvolvimento, conhecidos como metabólitos secundários. Geralmente, estes metabólitos influenciam diretamente os processos de respiração, fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os metabólitos secundários se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita dentre os vegetais, podendo restringir-se a uma única espécie. Isto não ocorre com os metabólitos primários que podem ser encontrados em todo o reino vegetal (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Os estudos sobre os metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, visando à obtenção e identificação de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e utilização em indústrias (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

O avanço das técnicas de identificação de moléculas abriu caminho para o estudo do metabolismo secundário de plantas que vem crescendo nos últimos 60 anos (BOURGAUD *ET AL.*, 2001). Graças ao avanço das técnicas bioquímicas e da biologia molecular o estudo do efeito dos metabólitos secundários trouxe um entendimento mais claro da sua importância na adaptação das plantas com o meio ambiente (BOURGAUD *ET AL.*, 2001).

Os compostos secundários são classificados de acordo com sua rota de síntese e podem ser divididos em três grandes grupos, sendo eles os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (BOURGAUD *ET AL.*, 2001; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Sugere-se que muitos metabólitos secundários possuam funções ecológicas importantes para os vegetais, como proteção contra herbívoros e infecções por micro-organismos patogênicos, atuação como atrativos para a polinização e dispersão de sementes, atuação na competição planta-planta e simbiose planta-micro-organismo.

É comum encontrar em plantas, monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, mais conhecidos como óleos essenciais, os quais conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados

em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012). Estes compostos podem influenciar organismos que se encontram próximos as plantas.

Em 1996, a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu o termo alelopatia como sendo “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e o desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos” (REIGOSA *ET AL.*, 2006).

Dentre os compostos secundários, os terpenos voláteis, constituintes dos óleos essenciais, têm reconhecido efeito alelopático e constituem a maior classe de produtos secundários (DUDAI *ET AL.*, 1999). Os terpenoides são biossintetizados pela rota do ácido mevalônico a partir de três moléculas de acetil CoA, resultando em isopentenil difosfato (IPP), e através da rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre no cloroplasto e outros plastídios, na qual a partir de gliceraldeído 3-fosfato e piruvato resulta no final do ciclo em dimetialil difosfato (DMAPP). O IPP e seu isômero DMAPP são moléculas básicas na formação dos terpenoides, tais compostos contendo 5 carbonos reagem formando geranyl difosfato (C<sub>10</sub>), molécula que origina quase todos os monoterpênicos conhecidos, a adição de mais um IPP ou DMAPP produz farnesil difosfato (C<sub>15</sub>), precursor da maioria dos sesquiterpenos (PARÉ E TUMLINSON, 1999; VICKERS *ET AL.*, 2009; LUIZA ISHII-IWAMOTO *ET AL.*, 2012; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Os terpenoides possuem funções importantes na vida das plantas agindo como atrativos de polinizadores (PICHESKY E GERSHENZON, 2002; THEIS E RAGUSO, 2005; SVENSSON *ET AL.*, 2011; STEENHUISEN *ET AL.*, 2012), atuando na sinalização em resposta aos patógenos (HUANG *ET AL.*, 2003; LERDAU E GRAY, 2003), sinalização em resposta ao ataque de herbívoros (BALDWIN E PRESTON, 1999; PARÉ E TUMLINSON, 1999; SCHMELZ *ET AL.*, 2003), atrativo de inimigos naturais de herbívoros (PARÉ E TUMLINSON, 1999; UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação repelente contra herbívoros (UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação inseticida (LABINAS E CROCOMO, 2002), ação bactericida (INOUE *ET AL.*, 2004), ação nematocida (NTALLI *ET AL.*, 2010; NTALLI *ET AL.*, 2011), e em resposta aos estresses abióticos (VICKERS *ET AL.*, 2009). Outro efeito importante dos terpenoides é seu efeito alelopático sobre as plantas, apresentando inibição da germinação e crescimento (ROMAGNI *ET AL.*, 2000; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2007), redução do teor de clorofila (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2006; SETIA *ET AL.*, 2007), redução da respiração (ABRAHIM *ET AL.*, 2000; SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002), redução da taxa de divisão celular (ROMAGNI *ET AL.*, 2000), quebra da integridade da

membrana celular (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007), inibição da abertura estomática (RAI *ET AL.*, 2003), inibição da síntese de DNA (NISHIDA *ET AL.*, 2005) além de causar estresse oxidativo (SINGH *ET AL.*, 2006; HE *ET AL.*, 2009) e injúrias foliares (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007).

Dudai *et al.* (1999) estudaram o efeito de trinta e dois óleos essenciais, e os resultados evidenciaram efeito alelopático em vinte e oito na germinação de *Triticum aestivum* L. (trigo), *Brassica nigra* (L.) Koch (mostarda-preta) e *Amaranthus palmeri* S. Watson (caruru). Os autores sugerem que os óleos essenciais possuem potencial em inibir a emergência de plantas daninhas, mas que ainda são necessários estudos para aplicá-los na agricultura. Estes resultados ressaltam o potencial dos óleos essenciais na obtenção de herbicidas biodegradáveis, que poderão ser utilizados na agricultura.

Paralelamente, o uso rotineiro de herbicidas sintéticos tem gerado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, gerarem risco para a fauna silvestre e contaminarem os alimentos que entram na dieta humana. Há necessidade de superar os paradigmas a respeito do controle de plantas daninhas, buscando métodos que sejam eficientes no controle e que respeitem os interesses da sociedade e os recursos naturais (GRANA *ET AL.*, 2012).

Dentre todos os fatores que reduzem a produtividade das culturas, as plantas daninhas certamente encontram-se entre as maiores causas de redução da produtividade, podendo representar mais de 25% do custo de produção para o seu controle. Dentre as plantas daninhas mais significativas na redução da produtividade de soja no estado do Paraná, encontra-se a *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*, principalmente pelo difícil controle empregado e pelas perdas ocasionadas a cultura (MOORE *ET AL.*, 1998). Ainda de acordo com os resultados obtidos por estes autores, a infestação de 10 plantas por m<sup>-2</sup> de *Euphorbia heterophylla* ou de *Ipomoea grandifolia* reduz 22 e 35% a produtividade, respectivamente. Estes resultados destacam o impacto que estas plantas daninhas apresentam sobre a cultura, caso não sejam controladas.

Devido à escassez de mão de obra, as pequenas propriedades fazem uso mais intensivo do controle químico de plantas daninhas, intensificando a utilização agrotóxicos na produção de alimentos.

Assim, o desenvolvimento de bioherbicidas não só ajudará no manejo, como na preservação do meio ambiente e na melhoria da qualidade do produto final que chega ao consumidor, reduzindo os resíduos de agrotóxicos.

O Brasil desponta na lista de maiores consumidores de agrotóxicos per capita do mundo com 5,2 kg por habitante, que representa 9 bilhões de dólares, causando problemas ambientais irreversíveis (SENADO, 2012)

Os casos de resistência das plantas daninhas aliados à utilização indiscriminada de um ou alguns herbicidas com o mesmo mecanismo de ação dificultam cada vez mais o controle destas plantas daninhas, que pode acarretar em significativo aumento no custo de produção da cultura. A utilização de um único mecanismo de ação seleciona indivíduos resistentes (EMBRAPA, 2012). A resistência aos princípios ativos largamente utilizados como o glifosato está relacionada à utilização da soja transgênica resistente ao glifosato (Soja Roundup Ready®), que, devido à pressão de seleção gerada pela utilização contínua de uma única molécula, seleciona populações resistentes de diversas espécies ao redor do mundo (POWLES, 2008).

O método de controle químico, pela facilidade e eficácia, quando comparado aos outros métodos que se tornam inviáveis pela escassez de mão de obra e/ou alto custo econômico, ainda é predominante. A utilização de aleloquímicos aproveitaria todo o maquinário utilizado no controle químico e reduziria os problemas ambientais, além de disponibilizar outras moléculas e até novos mecanismos de ação para o controle de plantas daninhas resistentes. Assim, a alelopatia, além de facilitar o entendimento das interações biológicas nos ecossistemas, pode ser diretamente empregada na agricultura.

Apesar dos estudos já realizados, não se encontram na literatura informações mais detalhadas sobre o efeito dos óleos essenciais e seu mecanismo de ação, em especial do *Cymbopogon winterianus* (capim-citronela) e *Eucalyptus cinerea* (eucalipto-prateado), assim como dos monoterpenos citronelal, geraniol e citronelol em plantas daninhas de importância agrícola no Brasil. Desta forma, o estudo dos efeitos dos óleos essenciais e monoterpenos, na germinação, crescimento e mesmo no metabolismo fotossintético pode auxiliar sobremaneira o entendimento da ação destes compostos em inibir a germinação e/ou crescimento de plantas invasoras de interesse para a agricultura brasileira. Além disso, este estudo pode fornecer subsídio para o isolamento e teste de novas moléculas com potencial para substituir os atuais herbicidas, com possível menor impacto ambiental. Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade bioherbicida do óleo essencial de *C. winterianus*, óleo essencial de *E. cinerea*, citronelal, geraniol e citronelol sobre a germinação e crescimento inicial de *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* e *Glycine max*.



## REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, D.; BRAGUINI, W. L.; KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 3, p. 611-624, 2000.
- BALDWIN, I. T.; PRESTON, C. A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, n. 2, p. 137-145, 1999.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R. K. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences*, v. 61, n. 7-8, p. 465-471, 2006.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KOHLI, R. K.; KAUR, S.; YADAV, S. S. Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. **Agronomy for sustainable development**, v. 27, n. 3, p. 171-177, 2007.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 10/ 2001.
- DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079-1089, 1999.
- EMBRAPA. **Sistemas de Produção -Tecnologia de Produção de Soja** - Região Central do Brasil 2012 e 2013, 2012.
- GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L.; PIMENTEL, N. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 01, p. 23-28, 2009.
- HE, H.; WANG, H.; FANG, C.; LIN, Y.; ZENG, C.; WU, L.; GUO, W.; LIN, W. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on *Echinochloa crus-galli*. **Weed research**, v. 49, n. 2, p. 183-192, 2009.
- HUANG, J.; CARDOZA, Y. J.; SCHMELZ, E. A.; RAINA, R.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 767-775, 2003.
- INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 325-331, 2004.
- LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.

LERDAU, M.; GRAY, D. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. **New Phytologist**, v. 157, n. 2, p. 199-211, 2003.

LUIZA ISHII-IWAMOTO, E.; MARUSA PERGO COELHO, E.; REIS, B.; SEBASTIAO MOSCHETA, I.; MOACIR BONATO, C. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, p. 50-64, 2012.

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187-1203, 2005.

NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010.

NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest management science**, v. 67, n. 3, p. 341-351, 2011.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Manag Sci**, v. 64, n. 4, p. 360-5, 2008.

RAI, V.; GUPTA, S.; SINGH, B. Volatile monoterpenes from *Prinsepia utilis* L. leaves inhibit stomatal opening in *Vicia faba* L. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 1, p. 121-124, 2003.

REIGOSA, R.; JOAQUÍN, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. S. **Allelopathy : a physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006.

ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 1, p. 303-313, 2000.

SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 295-306, 2003.

SENADO, A. Brasileiro ingere 5 kg de agrotóxicos por ano. 2012. Disponível em: < <http://www12.senado.gov.br/noticias/materias/2012/11/08/brasileiro-ingere-5kg-de-agrotoxicos-por-ano> >.

SETIA, N.; BATISH, D.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 63-67, 2007.

SINGH, H.; BATISH, D.; SETIA, N.; KOHLI, R. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of applied biology**, v. 146, n. 1, p. 89-94, 2005.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K.  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2006.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R. K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 2, p. 111-116, 2002.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 347-350, 2002.

SOUZA FILHO, A.; PEREIRA, A.; BAYMA, J. Allelochemical produced by the forage grass *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

STEENHUISEN, S. L.; RAGUSO, R. A.; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, Sep 20 2012.

SVENSSON, G. P.; PELLMYR, O.; RAGUSO, R. A. Pollinator attraction to volatiles from virgin and pollinated host flowers in a yucca/moth obligate mutualism. **Oikos**, v. 120, n. 10, p. 1577-1583, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5th Ed. 782, 2012.

THEIS, N.; RAGUSO, R. A. The effect of pollination on floral fragrance in thistles. **J Chem Ecol**, v. 31, n. 11, p. 2581-600, 2005.

UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2009.

VICKERS, C. E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M. T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 5, p. 283-291, 2009.

VOLL, E.; GAZZIERO, D.; BRIGHENTI, A.; ADEGAS, F. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 17-24, 2002.

## CAPÍTULO 1

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* NA GERMINAÇÃO E  
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Glycine max*, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia  
heterophylla*

## ABSTRACT

The objective of this work was to study the effect of the essential oil of *Eucalyptus cinerea* on germination and growth of *Glycine max* L. Merrill (soybean), *Ipomoea grandifolia* and *Euphorbia heterophylla*. Seeds of those species were submitted to different concentrations (0 to 1% with 2% DMSO, v/v) of the essential oil *E. cinerea*. Seeds were placed to petri dishes with the corresponding concentrations of the essential oil and placed in BOD at 25°C with 12h photoperiod for 7 days. Germination percentage (PGER), average germination time (VMG), average germination speed (VMG), speed germination index (IVG), shoot length (CPA), length of root system (CSR), total length (CT), aerial/root length ratio (RPA/SR), shoot fresh weight (MFPA), root fresh weight (MFSR), total fresh weight (MFT), shoot dry weight (MSPA), root dry weight (MSSR), total dry matter (MST), shoot water content (CAPA), root water content (CAR) and total water content (CAT). Data were submitted to ANOVA and quantitative variables analyzed by the polynomial regression ( $p < 0.05$ ). *E. cinerea* essential oil inhibited germination and its effect was directly proportional to the increased concentration tested in all species studied. Variables germination PGER, VMG, IVG, TMG were dramatically affected by the presence of the essential oil in the three species tested. CT, CPA, CSR and RPA/SR values also showed significant results tending to zero in all species. The presence of essential oil markedly reduced MFPA, MFSR, MFT, MSPA, MSSR, MST, CAPA, CAR and CAT values among the three species. Thus, *E. cinerea* essential oil has great potential to be used as bioherbicide. However, there is need for more detailed in metabolic and field level so that definitive conclusions can be obtained from studies.

*Keywords:* 1,8-cineole. Allelopathy. Weed. Soybean.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* sobre as variáveis de germinação e crescimento de *Glycine max* L. Merrill (soja), e das plantas daninhas *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro). As sementes das três espécies foram submetidas às diferentes concentrações (0 a 1% com 2% de DMSO, v/v) do óleo essencial de *E. cinerea*. As sementes foram dispostas em placas de petri com as concentrações correspondentes do óleo essencial e acondicionadas em câmara BOD (demanda biológica de oxigênio) a 25°C com fotoperíodo de 12h por 7 dias. Foram determinadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (PGER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), massa seca total (MST), conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR) e conteúdo de água total (CAT). Os dados foram submetidos à ANOVA e as variáveis quantitativas analisadas por regressão polinomial a 5% de probabilidade.

O óleo essencial de *E. cinerea* inibiu a germinação, sendo seu efeito diretamente proporcional ao aumento da concentração testada em todas as espécies estudadas. As variáveis de germinação PGER, VMG, IVG, TMG foram drasticamente afetadas pela presença do óleo essencial nas três espécies testadas. Os valores de CT, CPA, CSR e RPA/SR também apresentaram reduções significativas em todas as espécies estudadas. A presença do óleo essencial reduziu acentuadamente os valores de MFPA, MFSR, MFT, MSPA, MSSR, MST, CAPA, CAR e CAT das três espécies estudadas. Assim, o óleo essencial de *E. cinerea* possui grande potencial para ser utilizado como bioherbicida. Entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados, em nível metabólico e em nível de campo para que conclusões definitivas possam ser obtidas.

Palavras-chave: 1,8-cineol. Alelopatia. Planta daninha. Soja.

## 1. INTRODUÇÃO

A observação de que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento de outras que se encontram nas proximidades é notavelmente antiga. Por muito tempo, esse fato foi tido como inexplicável (GOLDFARB *ET AL.*, 2009). Atualmente, sabe-se que as plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que influenciam diretamente os processos de respiração, fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os metabólitos secundários também se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita dentre os vegetais, podendo restringir-se a uma única espécie. Isto não ocorre com os metabólitos primários que podem ser encontrados em todo o reino vegetal (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Sabe-se que muitos metabólitos secundários possuem funções ecológicas importantes para os vegetais, como proteção contra herbívoros e infecções por micro-organismos patogênicos, atuação como atrativos para a polinização e dispersão de sementes, atuação na competição planta-planta e simbiose planta-micro-organismo. É comum se encontrar em plantas, monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, mais conhecidos como óleos essenciais, que conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012). Os terpenos voláteis apresentam funções importantes na vida das plantas agindo como atrativos de polinizadores (PICHERSKY E GERSHENZON, 2002; THEIS E RAGUSO, 2005; SVENSSON *ET AL.*, 2011; STEENHUISEN *ET AL.*, 2012), atuando na sinalização em resposta aos patógenos (HUANG *ET AL.*, 2003; LERDAU E GRAY, 2003), sinalização em resposta ao ataque de herbívoros (BALDWIN E PRESTON, 1999; PARÉ E TUMLINSON, 1999; SCHMELZ *ET AL.*, 2003), atrativo de inimigos naturais de herbívoros (PARÉ E TUMLINSON, 1999; UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação repelente contra herbívoros (UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação inseticida (LABINAS E CROCOMO, 2002), ação bactericida (INOUE *ET AL.*, 2004), ação nematicida (NTALLI *ET AL.*, 2010; NTALLI *ET AL.*, 2011), e em resposta aos estresses abióticos (VICKERS *ET AL.*, 2009). Outro efeito importante dos terpenoides é seu efeito alelopático sobre as plantas, apresentando inibição da germinação e crescimento (ROMAGNI *ET AL.*, 2000; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2007), redução do teor de clorofila (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2006; SETIA *ET AL.*, 2007), redução da respiração (ABRAHIM *ET AL.*, 2000; SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002), redução da taxa de divisão celular (ROMAGNI *ET AL.*, 2000), quebra da integridade da

membrana celular (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007), inibição da abertura estomática (RAI *ET AL.*, 2003), inibição da síntese de DNA (NISHIDA *ET AL.*, 2005) além de causar estresse oxidativo (SINGH *ET AL.*, 2006; HE *ET AL.*, 2009) e injúrias foliares (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007).

Em 1996, a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu o termo alelopatia como sendo “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e o desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos” (REIGOSA *ET AL.*, 2006).

A redução da biodiversidade em áreas com o predomínio de plantas de eucalipto (MORIANA *ET AL.*, 2002), assim como a redução das taxas de crescimento, sugere a liberação de compostos com efeito alelopático diretamente no ambiente e/ou pelo processo de decomposição da matéria orgânica no local.

Dentre os compostos secundários, os terpenos voláteis, constituintes dos óleos essenciais, têm reconhecido efeito alelopático e constituem a maior classe de produtos secundários (DUDAI *ET AL.*, 1999).

Apesar dos estudos já realizados sobre o efeito alelopático dos terpenos, não se encontram na literatura informações mais detalhadas sobre o efeito dos óleos essenciais e seu mecanismo de ação, em especial do *Eucalyptus cinerea* (eucalipto-prateado) em plantas daninhas de importância agrícola no Brasil. Desta forma, o estudo do efeito dos óleos essenciais na germinação, crescimento e mesmo no metabolismo fotossintético pode auxiliar sobremaneira o entendimento da ação destes compostos em inibir a germinação e/ou crescimento de plantas invasoras de interesse para a agricultura brasileira. Além disso, este estudo pode fornecer subsídio para o isolamento e teste de novas moléculas com potencial para substituir os atuais herbicidas, com possível menor impacto ambiental além de compreender melhor as interações entre o eucalipto e as plantas nativas. Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade bioherbicida do óleo essencial de *E. cinerea* sobre a germinação, crescimento e variáveis de trocas gasosas, fluorescência e de microscopia de *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* e *Glycine max*.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Glycine max* L. Merrill

A cultura da soja é uma das mais importantes produzidas no Brasil, sendo o segundo maior produtor mundial e responsável por 81,5 milhões de toneladas, ocupando área de 27,7 milhões de ha, representando significativa porção do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2014).

O Paraná é o segundo maior produtor nacional de soja, responsável por 15,9 milhões de toneladas (19,51% da produção brasileira), ocupando área de 4,8 milhões de hectares, sendo responsável por 5,94% da produção mundial de soja (BRASIL, 2014).

Dentre todos os fatores que reduzem a produtividade desta cultura, as plantas daninhas certamente encontram-se entre as maiores causas de redução da produtividade, podendo representar mais de 25% do custo de produção para o controle. Dentre as plantas daninhas mais significativas na redução da produtividade de soja no estado do Paraná, encontra-se a *Euphorbia heterophylla*, principalmente pelo difícil controle empregado e pelas perdas ocasionadas à cultura (MOORE ET AL., 1998).

Os casos de resistência aliados à utilização de um ou alguns herbicidas com o mesmo mecanismo de ação dificultam cada vez mais o controle de *E. heterophylla*, que pode acarretar em significativo aumento no custo de produção da cultura (GELMINI ET AL., 2001; GELMINI ET AL., 2005; TREZZI, 2009).

Outro fator determinante é relacionado as grandes corporações multinacionais após o advento dos transgênicos resistentes ao glifosato. Ao comercializar as sementes e o herbicida, essas corporações incentivam, de certa forma, a utilização de apenas um mecanismo de ação, que aumenta a pressão de seleção sobre as populações de plantas daninhas, aumentando a chance de surgimento de populações resistentes a este herbicida. Além disso, alguns herbicidas, como o glifosato, podem prejudicar o crescimento e mesmo a produtividade em plantas transgênicas. Powles (2008), testando doses crescentes de glifosato em plantas transgênicas de soja resistentes ao glifosato, verificou que este herbicida acarretou severa redução de biomassa, absorção de água e taxa fotossintética.

### 2.2. *Euphorbia heterophylla* L.

A *Euphorbia heterophylla* L., amendoim-bravo, leiteira, flor-de-poetas ou café-do-diabo é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae que possui ciclo anual, é alógama, apresentando característica lactescente com porte ereto de 30-80cm de altura. Suas folhas são glabras ou levemente pubescentes com forma variável e com 4-10 cm de comprimento. Esta planta se reproduz por sementes, sendo pouco ou medianamente suscetível à maioria dos herbicidas convencionais, apresentando casos de tolerância a alguns princípios ativos altamente empregados na agricultura atualmente (VIDAL E WINKLER, 2004; LORENZI, H., 2006; KERN *ET AL.*, 2009).

Os casos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas vêm sendo documentados no Brasil desde 1996, sendo registrada em média, uma espécie a cada ano. Atualmente no Brasil, a espécie mais preocupante é a *E. heterophylla*, pois além de seu centro de origem abranger Brasil-Paraguai, proporcionando grande variabilidade genética, apresenta grande impacto econômico na agricultura. Esta espécie está presente em mais de 70% das áreas de soja na região do planalto do estado do Rio Grande do Sul e em grande parte do país (VIDAL E WINKLER, 2004).

A *E. heterophylla* causa diversos problemas a cultura da soja, como redução de 22% da produtividade da cultura, considerando uma densidade populacional da planta daninha de 10 plantas por metro quadrado (MOORE *ET AL.*, 1998). Outros resultados mais preocupantes indicam que apenas uma ou duas plantas de *E. heterophylla* por metro quadrado reduzem a quantidade de trifólios, o acúmulo de matéria seca e o teor de micronutrientes das plantas de soja, causando interferência devido ao estresse causado às plantas, acarretando alterações morfofisiológicas e redução na produção da cultura (CARVALHO *ET AL.*, 2010).

Com base nesses estudos, destaca-se a grande necessidade de novos métodos de controle, incluindo novos mecanismos de ação dos herbicidas utilizados para o efetivo controle desta espécie tão danosa para culturas com grande importância econômica para o país, como a soja. A *E. heterophylla* é resistente aos princípios ativos largamente utilizados como o glifosato. A resistência a este princípio ativo está relacionada à utilização da soja transgênica resistente ao glifosato, que, devido à pressão de seleção gerada pela utilização contínua de uma única molécula, seleciona populações resistentes de diversas espécies ao redor do mundo (POWLES, 2008).

### 2.3. *Ipomoea grandifolia*

A *Ipomoea grandifolia* conhecida popularmente como corda-de-viola, campainha, jetirana e corriola pertence à família Convolvulacea. Raramente é utilizada como planta ornamental e, por crescer sobre obstáculos, é utilizada para cobrir caramanchões. (AZANIA ET AL., 2010).

É uma espécie nativa da América do Sul, ocorrendo na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil, onde é a mais comum espécie de *Ipomoea* encontrada como infestante em lavouras. Possui ciclo anual de 120 a 180 dias e se reproduz por sementes; apresenta porte herbáceo com caule e ramos volúveis que se emaranham em plantas vizinhas e tem sido a espécie mais frequente em lavouras de soja, dificultando a colheita e causando diminuição da produtividade pela competição (DÍAZ-TIELAS ET AL., 2012).

Resultados obtidos por Moore *et al.* (1998) demonstram que apenas três plantas de *Ipomoea grandifolia* por metro quadrado reduzem cerca de 10% da produtividade de soja através da competição entre espécies, sem considerar as perdas ocasionadas na colheita, onde a simples presença desta espécie acarreta grandes prejuízos pelo aumento da dificuldade na colheita da soja. Dessa forma, faz-se necessário o controle desta espécie para evitar grandes prejuízos aos produtores.

### 2.4 *Eucalyptus cinerea*

O *Eucalyptus cinérea*, com sinonímia de *Eucalyptus pulvurulenta* F. Muell., também conhecido como eucalipto dólar-de-prata, eucalipto-prateado e eucalipto-cinzento é utilizado principalmente para fins ornamentais como na confecção de arranjos florais ou na ornamentação de jardins (ROTMAN E PAPERMASTER, 1966; HESLOP-HARRISON E HESLOP-HARRISON, 1970). Pertencente à família Myrtaceae é de origem australiana e aclimatada no Estado do Paraná. O rendimento da extração de óleo essencial é superior às demais espécies de eucalipto, apresentando atividade medicinal, destacando como principais constituintes do óleo essencial de *E. cinerea* o 1,8-cineol (75,7%),  $\alpha$ -terpineol (9,67%), ocimeno (8,42) e  $\alpha$ -pineno (6,21%) (HESLOP-HARRISON E HESLOP-HARRISON, 1970), resultado semelhante aos descritos por Pergo *et al.* (2008).

O óleo essencial de *E. cinerea* apresenta ação larvicida descrita por Kaur *et al.* (2012), onde se encontrou sua dose letal média (DL<sub>50</sub>) como sendo de 0,27 mg mL<sup>-1</sup> para o *Aedes aegypti*, destacando o potencial para o controle deste inseto.

Segundo Pergo *et al.* (2008) o efeito inseticida do óleo essencial de *E. cinerea* em *Musca domestica* L. apresenta DL<sub>50</sub> de 5,5 mg dm<sup>-3</sup> sendo sua utilização possível na elaboração de fumegantes compatíveis com alimentos e habitats humanos devido a sua alta eficiência. Entretanto, Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1970) descrevem a ação antimicrobiana do óleo essencial de *E. cinerea* em extrações com diferentes intervalos de tempo, caracterizando efeito antimicrobiano em todos os extratos obtidos em cinco microorganismos diferentes.

Estudos com óleo essencial volatilizado de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora*, visando o controle da planta daninha *Parthenium hysteropgorus* resultaram em redução da porcentagem de germinação, teor de clorofila, respiração celular, crescimento de plântulas, apresentando ainda extravasamento celular e injúria foliar (KOHLI *ET AL.*, 1998; SINGH *ET AL.*, 2005).

A aplicação do óleo essencial de *E. citriodora* em plantas de *Phalaris minor* Retz. causou redução drástica da massa seca das plantas, assim como no teor de clorofila, respiração celular, aumento do vazamento de eletrólitos e surgimento de injúrias foliares severas (BATISH *et al.* 2007). Observam-se ainda reduções de 92% na porcentagem de germinação de sementes de *Parthenium hysteropgorus* e redução da velocidade de germinação com óleo de *E. citriodora* e *E. globulus* (KOHLI *ET AL.*, 1998).

Existem poucos trabalhos realizados com óleo essencial de *E. cinerea*, provavelmente pela sua principal utilização para fins ornamentais, não havendo relato de efeito herbicida ou alelopático e muito menos de sua ação fisiológica. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a ação herbicida do óleo essencial de *E. cinerea* sobre as variáveis de germinação e crescimento de *Euphorbia heterophylla* L., *Ipomoea grandifolia* L. e *Glycine max* (L.) Merril.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

As sementes de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim bravo) e *Ipomoea grandifolia* L. (corda-de-viola) foram obtidas da empresa Cosmos® de São Paulo,

armazenadas em dessecador e acondicionado na geladeira. As sementes de *Glycine max* (L.) Merrill da variedade BRS 283 foram obtidas da Embrapa Soja.

### 3.2. Local dos experimentos

Os experimentos de germinação e crescimento foram realizados no Laboratório de Homeopatia e Fisiologia Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá – PR.

### 3.3. Método geral de germinação

As sementes de *E. heterophylla* L., *I. grandifolia* L. e *G. max* (L.) Merrill. foram lavadas em água corrente, esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos e, então, lavadas com água destilada por 6 vezes. Foram dispostas 50 sementes em cada placa de Petri com 12 cm de diâmetro para as espécies *E. heterophylla* e *I. grandifolia* e 25 sementes para *G. max*. Cada placa foi revestida com duas folhas de papel *germitest* previamente autoclavadas e umedecidas com 10 mL das soluções de cada tratamento para *E. heterophylla* e *I. grandifolia* e 15 mL das soluções de cada tratamento para *G. max*.

Os tratamentos foram constituídos de quatro concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* (0,13, 0,25, 0,5 e 1% (v/v)) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (2%, v/v). Os controles foram constituídos de água destilada pura e água destilada com DMSO (2%, v/v).

As placas foram dispostas de forma aleatória em câmara de germinação tipo BOD (demanda biológica de oxigênio), com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25 °C por 7 dias.

### 3.4. Determinação das variáveis de germinação

As variáveis de germinação foram determinadas de 12 em 12h (0 a 132h) após a semeadura. Contaram-se as sementes germinadas para os cálculos das variáveis de germinação, sendo consideradas germinadas as sementes com radícula igual ou superior a 2 mm. Ao término do experimento (132h), avaliou-se o comprimento radicular e da parte aérea das plântulas utilizando-se papel milimetrado.

As variáveis determinadas foram: porcentagem de germinação (PGER [%]), tempo médio de germinação (TMG [h]), velocidade média de germinação (VMG (h)), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA [cm]), comprimento do sistema radicular (CSR [cm]), comprimento total (CT [cm]), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa fresca da parte aérea (MFPA [mg]), massa fresca do sistema radicular (MFSR [mg]), massa fresca total (MFT [mg]), massa seca da parte aérea (MSPA [mg]), massa seca do sistema radicular (MSSR [mg]), massa seca total (MST [mg]), conteúdo de água da parte aérea (CAPA [mg]), conteúdo de água da raiz (CAR[mg] e conteúdo de água total (CAT [mg] ) (FERREIRA E BORGHETTI, 2004; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009).

#### 3.4.1. Porcentagem de germinação (PGER)

$$PGER = (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$$

Em que  $\sum n_i$  é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinar (N), expresso em porcentagem;

#### 3.4.2. Tempo Médio de Germinação (TMG)

$$TMG = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$$

Em que  $n_i$  é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo  $t_{i-1}$  e  $t_i$ , expresso em horas.

#### 3.4.3. Velocidade Média de Germinação (VMG)

É o inverso de TMG, expresso em horas.

$$VMG = \sum n_i / \sum n_i \cdot t_i$$

#### 3.4.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots G_n / N_n$$

Em que G1, G2.... Gn é o número de sementes germinadas e N1, N2...Nn é o número em horas após a sementeira.

#### 3.4.5. Razão parte aérea sistema radicular (RPA/SR)

$$\text{RPA/SR} = \text{CPA/CSR}$$

Onde CPA é o comprimento da parte aérea e CSR é o comprimento do sistema radicular.

#### 3.4.6. Conteúdo de água da parte aérea (CAPA)

$$\text{CAPA} = \text{MFPA} - \text{MSPA}$$

Onde MFPA é massa fresca da parte aérea e MSPA é massa seca da parte aérea, expressas em mg.

#### 3.4.7. Conteúdo de água da raiz (CAR)

$$\text{CAR} = \text{MFR} - \text{MSR}$$

Onde MFR é massa fresca da raiz e MSR é massa seca da raiz, expressa em miligrama.

#### 3.4.8. Conteúdo de água total (CAT)

$$\text{CAT} = \text{MFT} - \text{MST}$$

Onde MFT é massa fresca total e MST é massa seca total, expressa em miligrama.

#### 3.4.9. Massa seca (MS)

A massa seca foi obtida após a secagem (massa constante) das partes das plântulas em estufa a 70°C com auxílio de balança analítica.

#### 3.5. Análise do óleo essencial de *E. cinerea*.

A análise foi realizada em parceria com a Universidade de Coimbra (Portugal) por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

(GC/MS). A análise de GC foi realizada no equipamento Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), com sistema de tratamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.05.04 equipado com um único injetor e dois detectores de ionização de chama (FID). Um divisor Grapapak (Agilent Technologies, part no. 5021-7148) foi usado para amostragem simultânea em duas colunas Supelco ( Supelco, Bellefonte, PA, USA), com coluna capilar de sílica fundida contendo diferentes fases estacionárias (SPB-1 (polydimethylsiloxane 30m× 0,20mm i.d., espessura de filme de 0,20 m), e SupelcoWax-10 (polyethyleneglycol 30m × 0,20mm i.d., espessura de filme de 0,20 m). Programa de temperatura do forno de 70 – 220 °C (3 °C.min<sup>-1</sup>), 220°C (15 min); temperatura do injetor de 250°C; como gás veículo foi utilizado o hélio, ajustado a velocidade linear de 30 cm s<sup>-1</sup>, razão de divisão 1:40, temperatura dos detectores de 250°C.

CG/MS foi realizada no aparelho Hewlett-Packard 6890 cromatógrafo a gás equipado com coluna de sílica fundida HP1 (polidimetilsiloxano 30, x 0,25mm i.d., espessura do filme de 0,25 m) acoplado a um detector de massa seletiva Hellett-Packard 5973 (Agilent Tchnologies) operados por software ChemStation avançado HP, versão A.03.00. GC com parâmetros como descrito acima, temperatura de interface de 250 °C. MS quadruplo, com temperatura de 150°C, energia de ionização de 70 eV, ionização atual de 60 A, intervalo de varredura de 35-250 unidades, scans 1: 4,51.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por seus índices de retenção em ambos os SPB-1 e Supelcowax-10 colunas e do seu espectro de massa. Índices de retenção, calculados por interpolação linear em relação aos tempos de retenção de C8-C23 de n-alcenos, foram comparados com as amostras de referência incluídos no banco de dados do laboratório da C.E.F.- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os espectros de massa adquiridos foram comparados com espectros de referência do banco de dados do laboratório, banco de dados Wiley / NIST library (WILEY-REGISTRY, 2007) e dados da literatura (ADAMS, 1995; JOULAIN E KÖNIG, 1998). Quantidades relativas de cada componente foram calculadas baseando-se na área dos dados brutos de GC, sem fator de correção.

### 3.6. Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado variando de 4 a 6 concentrações do óleo essencial de *E. cinerea* e três espécies testadas (*E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max*). Foram utilizadas 4 repetições para as espécies *E. heterophylla* e *I.*



*grandifolia* e 8 repetições para *G. max*. Os dados foram submetidos à ANOVA e as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) analisadas por regressão polinomial pelo programa SISVAR (5.1). Os efeitos do óleo essencial nas três espécies foram analisados separadamente. Os gráficos foram obtidos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Composição do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea*.

O composto majoritário encontrado na análise por GC/MS foi o 1,8-cineol (65,8%),  $\alpha$ -pineno (8,3%) e limoneno (7,2%) (Tabela 1), assemelhando-se aos resultados encontrados por Franco et al (2005) que destaca como principais constituintes do óleo essencial de *E. cinerea* o 1,8-cineol (75,7%),  $\alpha$ -terpineol (9,67%), ocimeno (8,42) e  $\alpha$ -pineno (6,21%), resultado semelhante aos descritos por Palacios et al (2009).

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* avaliado por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

Composição do óleo essencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> F.v. Muell. Ex.Benth	
Composto	%
1,8-Cineol	65,8
$\alpha$ -Pineno	8,3
Limoneno	7,2
$\alpha$ -Terpinyl acetato	5,8
$\alpha$ -Terpineol	2,1
p-Cimeno	1,7
Outros compostos	4,3
Total de compostos identificados	95,2%

O 1,8-Cineol é o composto majoritário de outras espécies de *Eucalyptus* como o *E. globulus*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. viminalis* (BATISH ET AL., 2008). O 1,8-cineol pode ser encontrado em outras espécies como o *Ocimum basilicum* L. em menores quantidades (ROSADO ET AL., 2009) e em *Tanacetum aucheranum* e *Tanacetum chiliophyllum* (SALAMCIET AL., 2007).

##### 4.2. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação

Observa-se pelos resultados que o óleo essencial de *E. cinerea* influenciou significativamente as variáveis de germinação de *E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max* (Figuras 1, 2 e 3).

A concentração do óleo essencial para a inibição de 50% da germinação (DL<sub>50</sub>) foi diferente para as três espécies, quando comparado com o controle (DMSO, 2%) (Figuras 1A, 2A e 3A). As DL<sub>50</sub> encontradas para *E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max* foram de 0,44, 0,93 e 0,98%, respectivamente, indicando forte efeito inibitório na germinação das espécies estudadas. Destaca-se a DL<sub>50</sub> da *E. heterophylla* que indica inibição mais pronunciada em aproximadamente metade da dose necessária para inibir 50% da germinação nas outras duas espécies estudadas. Reis (2011), estudando o efeito alelopático do óleo de citronela, encontrou DL<sub>50</sub> para *E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max* de 0,06, 0,08 e 0,105%, respectivamente. Tal resultado aponta maior tolerância da *G. max* do efeito alelopático do óleo essencial de citronela. Por outro lado, *I. grandifolia* apresenta DL<sub>50</sub> baixa para o óleo de citronela, indicando que a tolerância ao óleo de *E. cinerea* é maior que do óleo essencial de citronela.

Estudos sobre o efeito do 1,8-cineol, componente majoritário do óleo essencial de *E. cinerea*, descrevem 77 e 44% de inibição na germinação de *Echinochloa crusgalli* e *Cassia obtusifolia*, respectivamente (ROMAGNI *et al.* 2000). Inibição total da germinação, vigor, comprimento da parte aérea e sistema radicular e teor de clorofila de *Parthenium hysterophorus* L. pelo óleo essencial de *Eucalyptus globulus* cujo composto majoritário é o 1,8-cineol, demonstram forte efeito inibitório (KOHLI *ET AL.*, 1998).

A inibição da germinação nas três espécies aqui estudadas pode ser causada pela inibição de todas as fases da mitose causado pelo 1,8-cineol (ROMAGNI *ET AL.*, 2000), e/ou pelo extravasamento celular (Batish *et al.* 2007). Estes autores testando o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, verificaram aumento significativo do vazamento de eletrólitos, indicando ação sobre a membrana plasmática. Estudos revelam que os monoterpenos podem causar danos à membrana mitocondrial (LORBER E MULLER, 1976), inibindo a respiração de mitocondrial e de ápices (REIS, 2011), respiração celular (SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2004; SETIA *ET AL.*, 2007), e respiração de plantas inteiras (BATISH *ET AL.*, 2007).

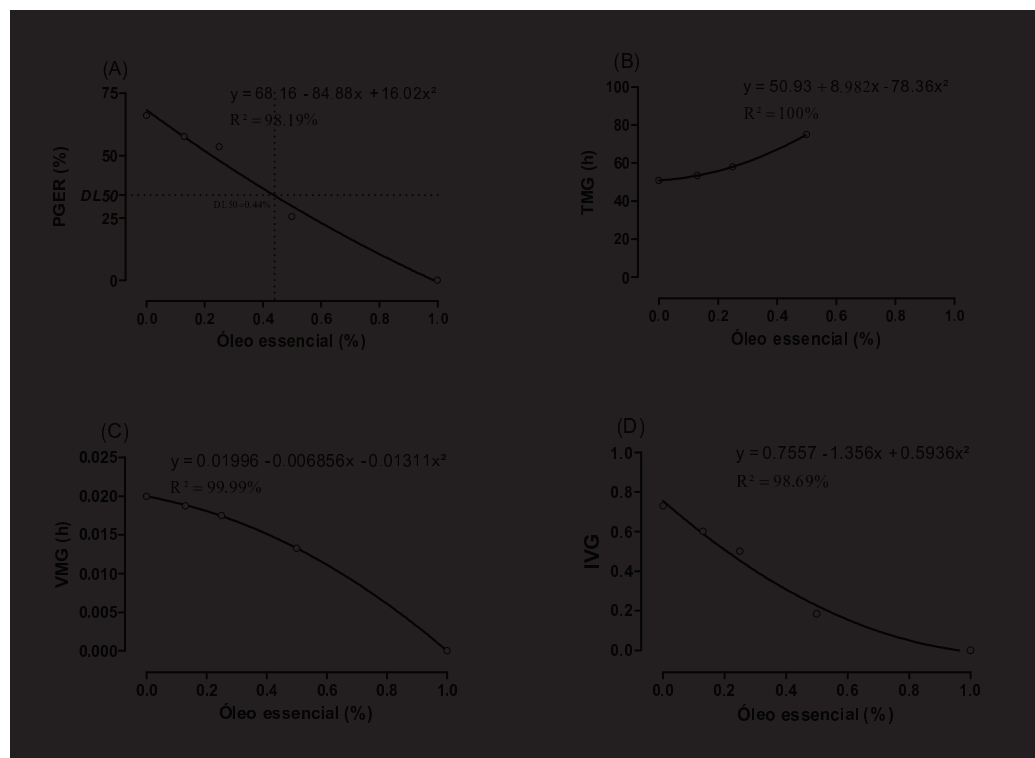


Figura 1 – Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

O tempo médio de germinação (TMG) representa o tempo que as sementes levaram para germinar em função da concentração de óleo essencial (Figuras 1B, 2B e 3B). A ausência dos pontos acima da dose de 0,5% da Figura 1B deve-se à inibição total da germinação, tendo os valores tendendo ao infinito.

O TMG fornece dados quantitativos e qualitativos, revelando problemas metabólicos no processo germinativo. O efeito inibitório do óleo essencial de *E. cinerea* sobre as variáveis PGER e TMG sugere que um ou alguns processos metabólicos da germinação estão sendo afetados. A inibição de todas as fases da mitose por 1,8-cineol (ROMAGNI *ET AL.*, 2000) e/ou interferência dos monoterpenos na membrana e respiração celular (BATISH *ET AL.*, 2007) podem afetar a germinação. O aumento do TMG pode ser resultado da redução da disponibilidade de ATP pela redução da taxa respiratória e/ou reflexo direto na inibição da mitose celular. A taxa de mitose pode ser afetada pela inibição da respiração. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser feitos para elucidar estes resultados.

Em nível de campo, o aumento do TMG reduz a viabilidade das sementes no solo, reduzindo suas chances de chegar a vida adulta pelo maior tempo de exposição aos microorganismos patogênicos presentes no solo, indicando capacidade competitiva reduzida se comparada a outra semente com um TMG menor (FERREIRA E BORGHETTI, 2004).

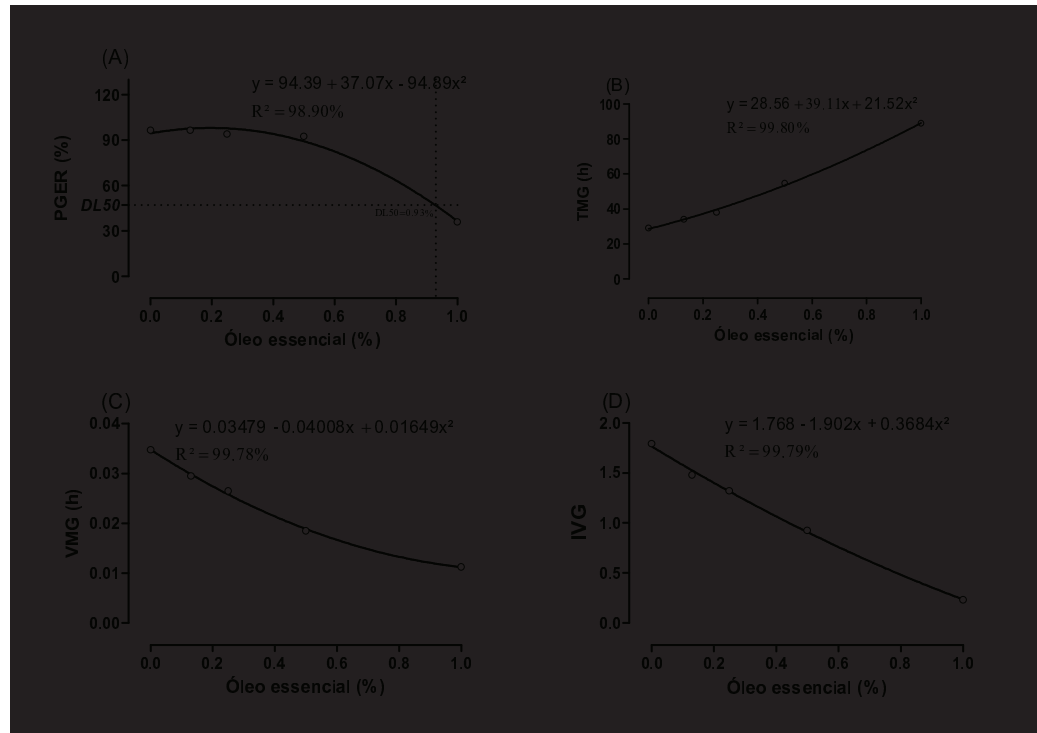


Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *I. grandifolia*.

A velocidade média de germinação (VMG) representa a velocidade de germinação das sementes estudadas, expressa em horas. A redução significativa da VMG com o aumento da concentração de óleo essencial de *E. cinerea*, assim como o TMG, indica interferência em um ou alguns processos metabólicos essenciais à germinação das espécies estudadas (Figuras 1C, 2C e 3C).

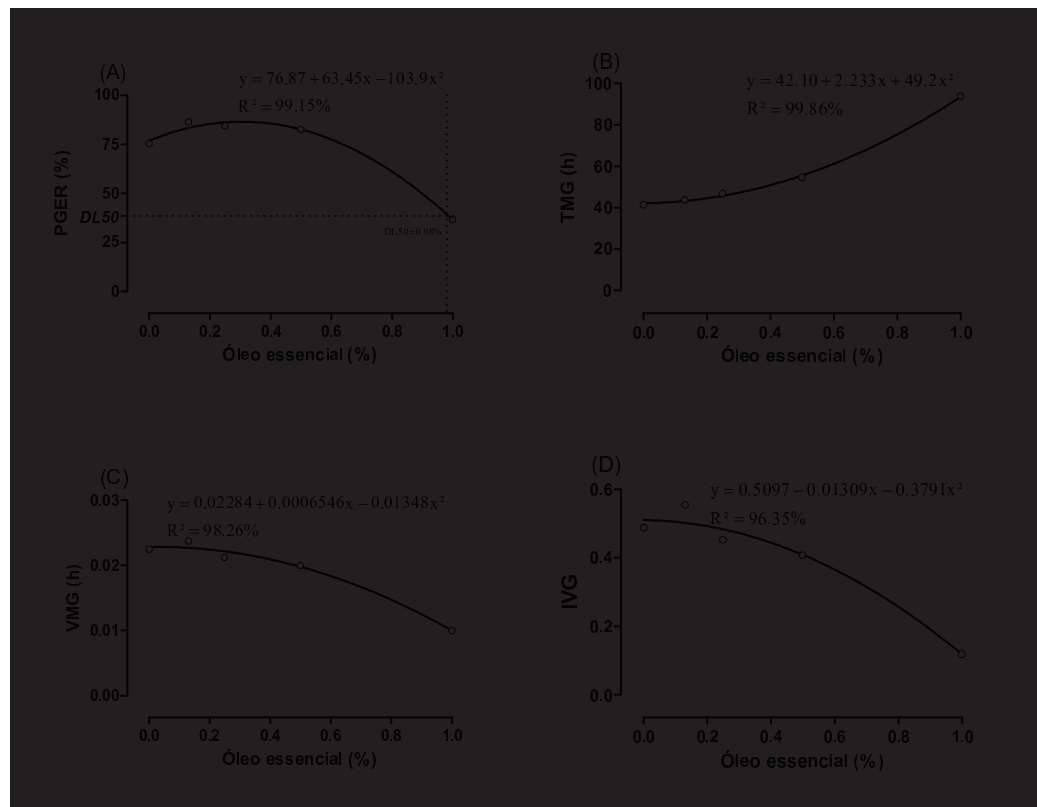


Figura 3 - Efeito do óleo essencial de *E.cinerea* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *G. max*.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi influenciado significativamente pelo aumento de concentração de óleo essencial nas três espécies estudadas (Figuras 1D, 2D e 3D). Rosado *et al.* (2009) descrevem resultados significativos de inibição do extrato aquoso de manjeriço (contém 1,8-cineol) nas variáveis de IVG e PGER das culturas de tomate, alface e melissa.

De maneira geral, a análise das variáveis de germinação (Figuras 1, 2 e 3) indica que o óleo essencial de *E. cinerea* influencia o processo germinativo em termos quantitativos e qualitativos. A interferência do óleo essencial pode estar ocorrendo diretamente em algum ou alguns processos embrionários de forma letal, como o processo respiratório (LORBER E MULLER, 1976; REIS, 2011), impedindo a germinação e/ou retardar a degradação e/ou mobilização de reservas do endosperma para o embrião, tornando o processo germinativo mais lento.

### 4.3. Efeito do óleo essencial sobre as variáveis de crescimento

Os valores das variáveis biométricas de crescimento foram inibidos pela presença do óleo essencial de *E. cinerea* nas três espécies estudadas (Figuras 4, 5 e 6). Para a *E. heterophylla* e *I. grandifolia*, observa-se inibição total do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR) e, conseqüentemente, do comprimento total (CT) e da relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) na dose de 1% de óleo essencial (Figuras 4 e 5). Estes resultados sugerem maior susceptibilidade ao óleo de *E. cinerea* quando comparada a *G. max* cujos valores de CSR, CPA e, conseqüentemente, RPA/SR e CT não foram totalmente inibidos pela dose de 1% de óleo essencial (Figura 6).

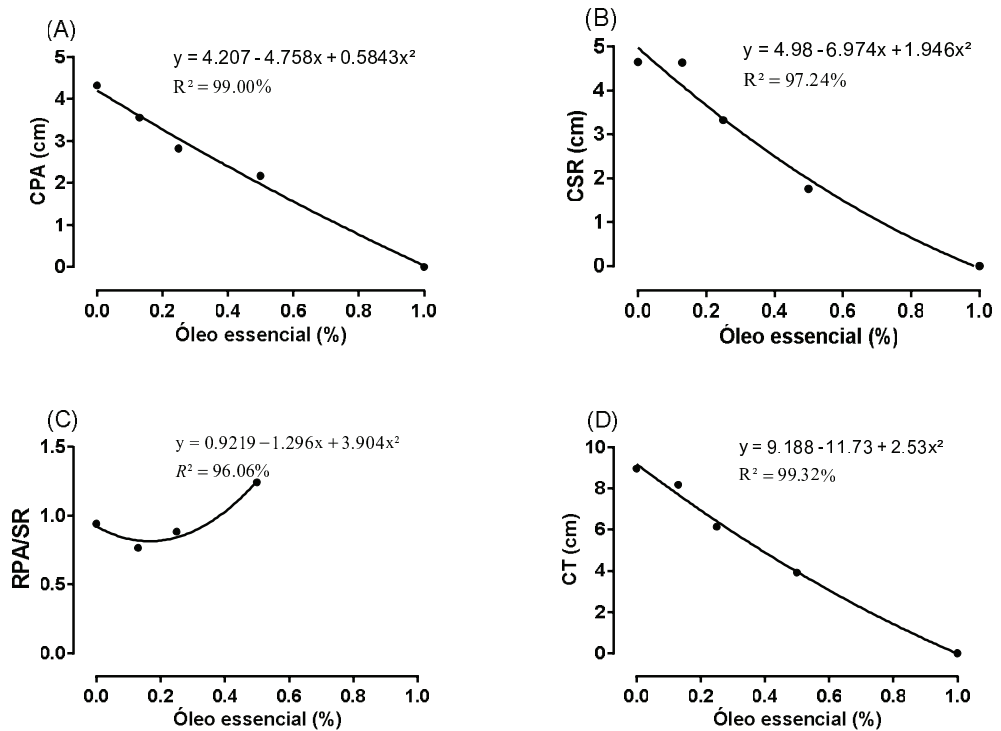


Figura 4 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *E. heterophylla*.

O CPA foi reduzido à zero para *E. heterophylla* e *I. grandifolia* pelo aumento das doses de óleo essencial (Figuras 4A e 5A), entretanto, para *G. max*, a inibição da CPA não chegou a ser total (Figura 6A). O CSR de *E. heterophylla* e *I. grandifolia* também foi reduzido a zero na maior dose testada (Figuras 4B e 5B), diferentemente de *G. max*, onde se observa inibição também significativa, porém em magnitude menor que a anterior (Figura 6B). Conseqüentemente, o CT das três espécies estudadas foi afetado significativamente pelo aumento das doses de óleo essencial (Figuras 4D, 5D e 6D), destacando mais uma vez a menor inibição para a espécie *G. max* (Figura 6D). Esta aparente diferença de susceptibilidade entre espécies, provavelmente, seja pela diferença de tamanho entre as sementes, uma vez que a *G. max* apresenta maior quantidade de reserva, que poderia suprir de certa forma a redução da respiração e/ou extravasamento de eletrólitos pela membrana celular, demonstrando-se mais tolerante do que espécies que possuem sementes com pequena quantidade de reserva.

De maneira geral, as três espécies apresentaram diferenças significativas na RPA/SR, demonstrando que o sistema radicular foi mais inibido quando comparada com a parte aérea de *G. max* (Figura 6C), entretanto, para *E. heterophylla*, a parte aérea foi mais afetada (Figura 4C).

O contato direto do óleo essencial com as raízes acarreta injúria celular, que pode diminuir a absorção de água e/ou elementos minerais e, conseqüentemente, o transporte destes compostos para a parte aérea. A inibição dos terpenos sobre a respiração celular pode ainda acarretar redução do crescimento da planta (SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2007; REIS, 2011)

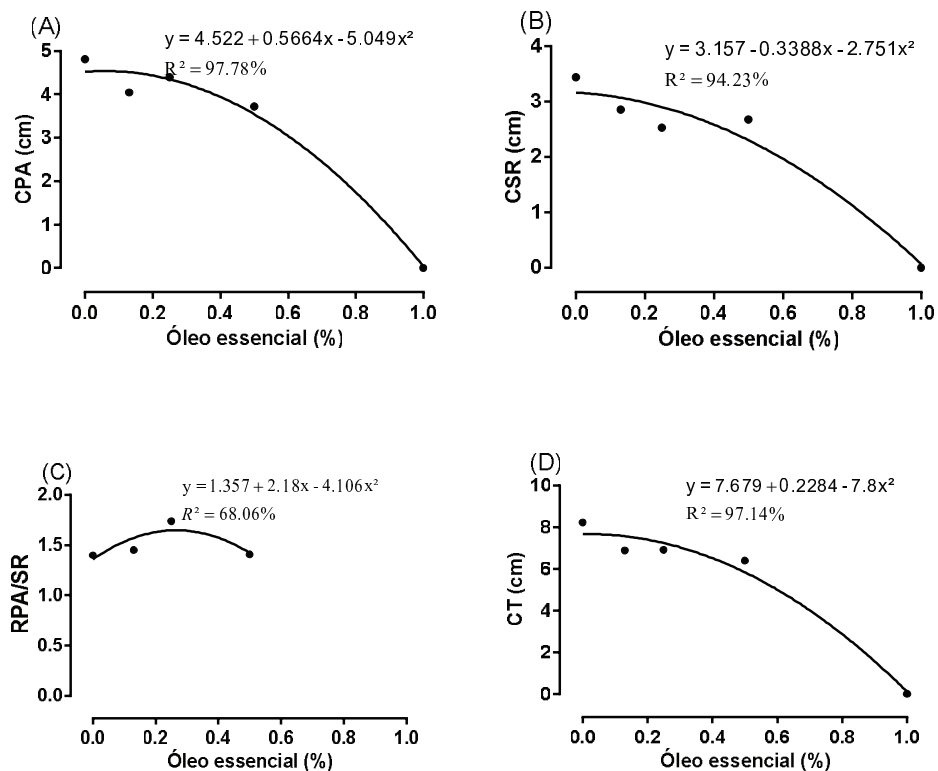


Figura 5 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *I. grandifolia*.

Considerando que o crescimento da planta é a resultante da divisão e alongamento celular (TAIZ E ZEIGER, 2012), qualquer interferência em um ou ambos os processos compromete o crescimento das plantas. Existem evidências da ação dos terpenoides sobre a integridade da membrana plasmática (LORBER E MULLER, 1976; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007), levando a perda de eletrólitos importantes para a manutenção do turgor celular, força motriz da expansão celular. Outras evidências da inibição no CPA e CSR de *Echinochloa crusgalli* e *Cassia obtusifolia* submetidas às doses crescentes de 1,8-cineol foram observadas em todas as fases da mitose (ROMAGNI *ET AL.*, 2000).

Entretanto, o aumento do tempo médio de germinação (TMG) causado pelo óleo essencial pode causar diferença no comprimento final das plântulas por reduzir o tempo efetivo de crescimento entre a germinação e a avaliação final do experimento. Outros experimentos estão sendo estudados para reduzir essa influência do TMG sobre as variáveis



biométricas avaliadas (MPA, MSSR e CT) das plântulas de *E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max*. Tais evidências do efeito dos terpenoides sobre a divisão e interferência no mecanismo responsável pelo alongamento celular podem explicar em parte o efeito do óleo essencial de *E. cinerea* sobre o crescimento das espécies estudadas.

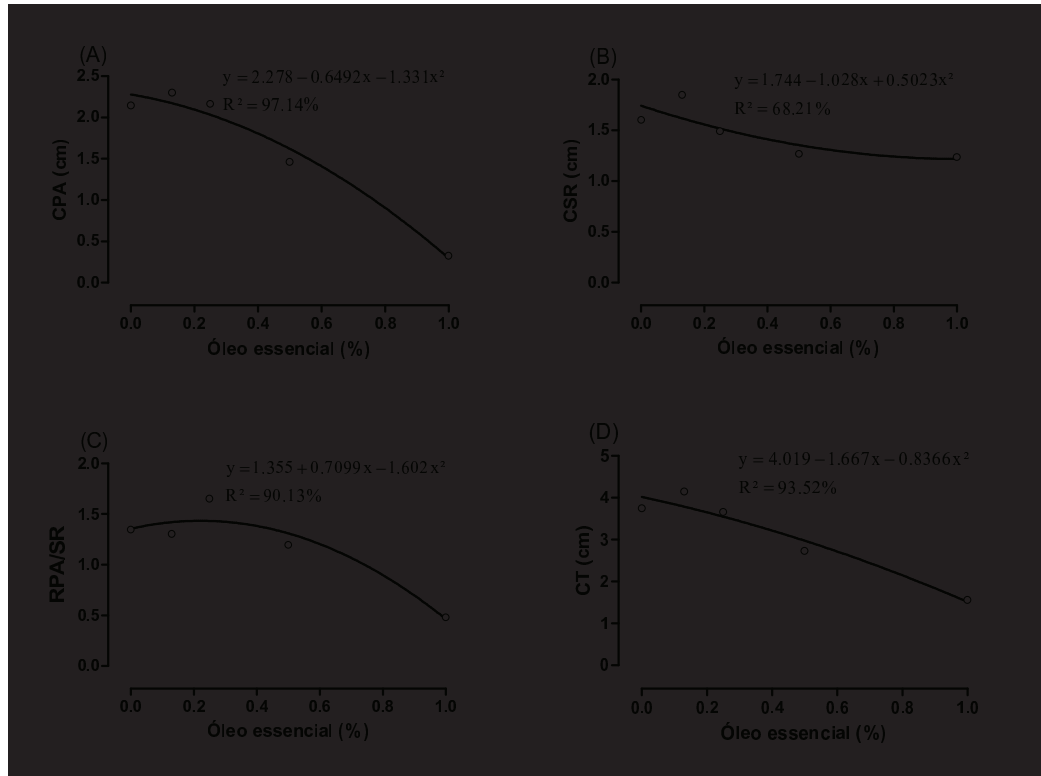


Figura 6 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *G. max*.

Os valores de biomassa fresca representada pelas variáveis massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR) e massa fresca total (MFT) indicam que um ou alguns fatores relacionados à assimilação e à fixação de carbono foram afetados.

A massa fresca da parte aérea (MFPA) apresentou inibição significativa, tendendo a zero para as três espécies (Figuras 7A, 8A e 9A). A acentuada inibição do acúmulo de MFPA em doses de até 1% de óleo essencial de *E. cinerea* indica forte efeito alelopático sobre as espécies estudadas.

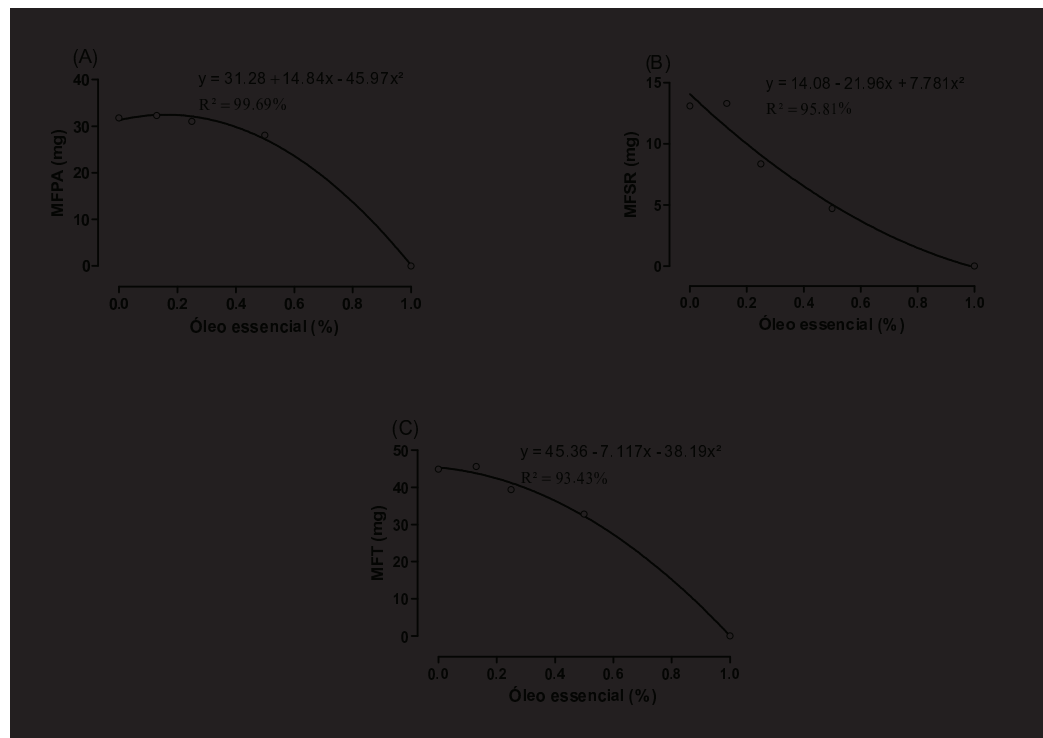


Figura 7 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR) e massa fresca total (MFT) de *E. heterophylla*.

Da mesma forma que a MFPA, o acúmulo de MFSR foi severamente inibido em *E. heterophylla* e *I. grandifolia*, onde seus valores aproximaram-se a zero (Figuras 7B e 8B), entretanto, para *G. max*, a inibição das doses estudadas se restringiu a cerca de 50% do valor de MFSR, indicando, mais uma vez, que a soja apresenta maior tolerância às doses de óleo essencial testadas.

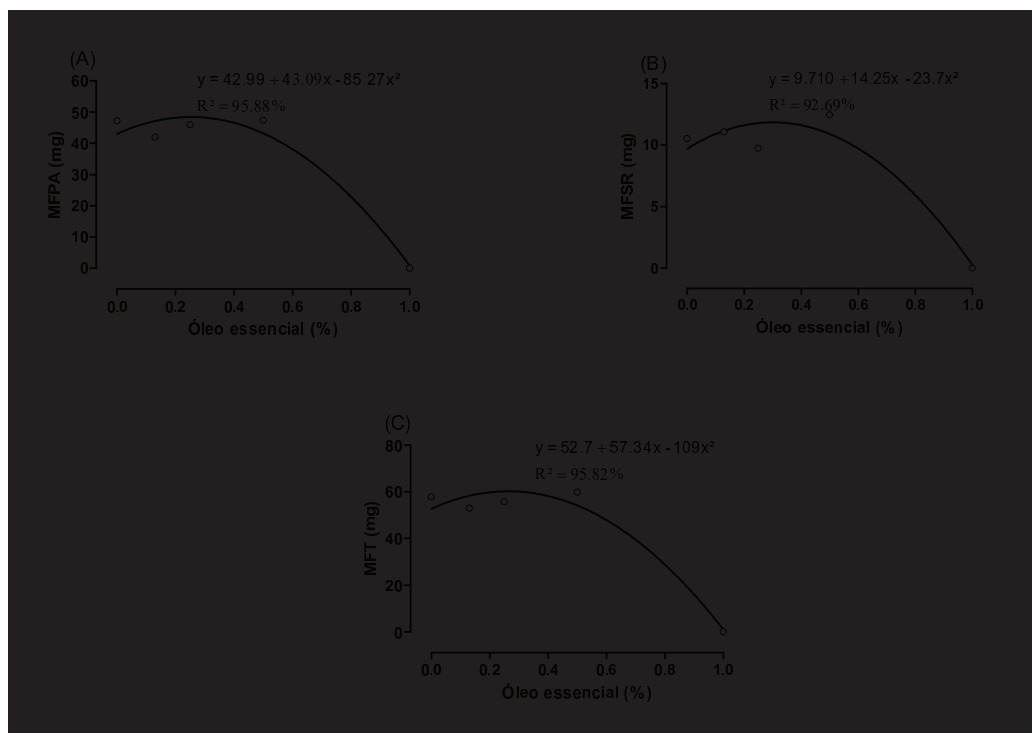


Figura 8 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR) e massa fresca total (MFT) de *I. grandifolia*.

A variável massa fresca total (MFT), sendo o somatório da MFPA e MFSR, segue a tendência de inibição significativa, chegando a zero (não ocorreu protrusão da radícula) em *E. heterophylla* e *I. grandifolia* (Figuras 7C e 8C), entretanto, em *G. max*, a inibição, mesmo significativa, não chega a ser total.

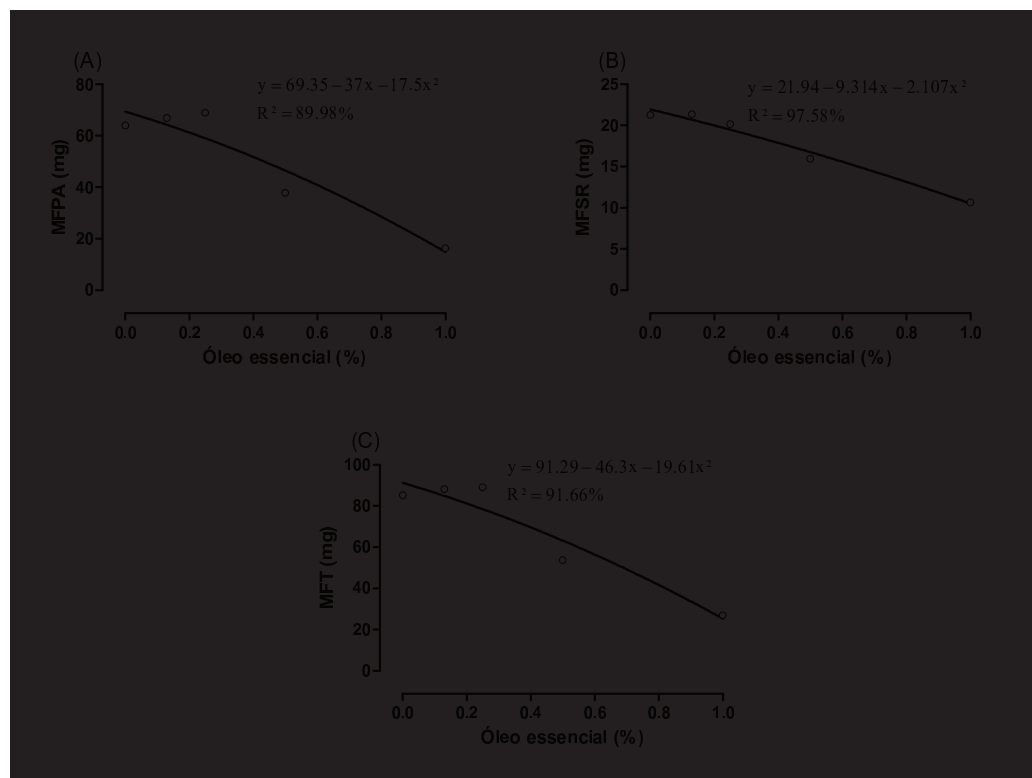


Figura 9 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFR) e massa fresca total (MFT) de *G. max*.

As variáveis de biomassa seca, melhor que os valores da biomassa fresca, explicam os efeitos alelopáticos inibitórios do óleo essencial de *E. cinerea* sobre diferentes espécies, uma vez que representa diretamente o acúmulo de carbono e elementos minerais da planta.

A variação de biomassa foi profundamente afetada pelo aumento da dose de óleo essencial de *E. cinera* nas três espécies estudadas (Figuras 10A, 11A e 12A). A massa seca da parte aérea (MSPA) chegou a valores muito próximos de zero para *E. heterophylla* e *I. grandifolia*, entretanto, para *G. max*, os valores de MSPA não foram totalmente inibidos pela dose máxima de óleo essencial testada (1%).

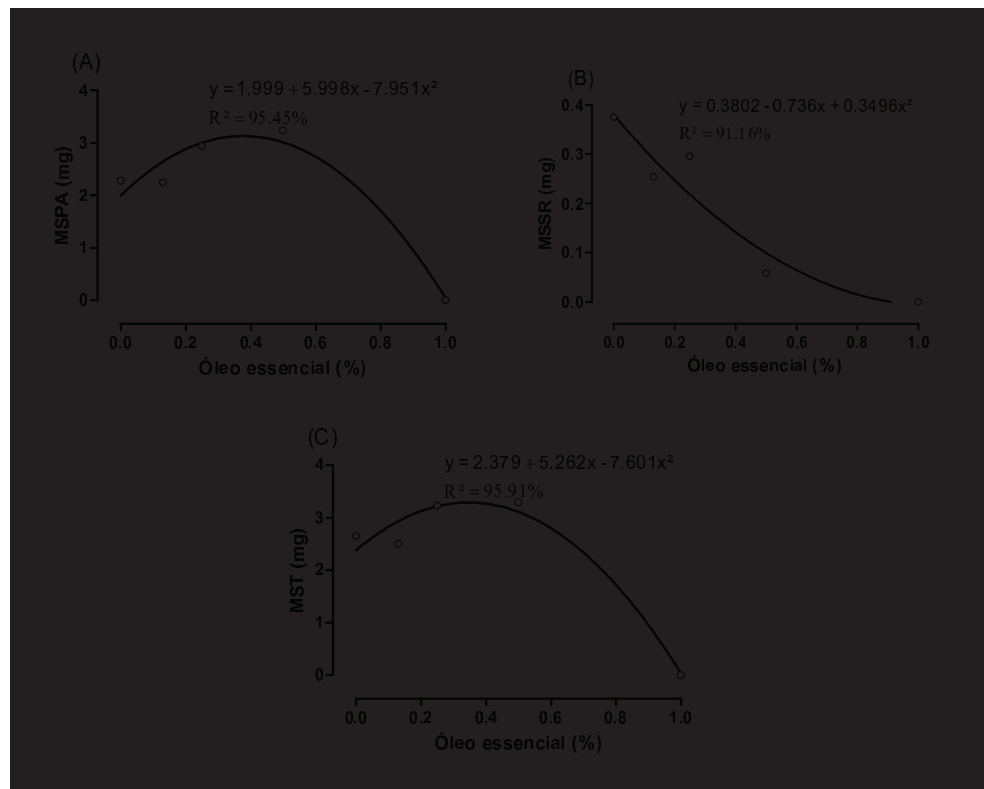


Figura 10 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MST) de *E. heterophylla*.

A massa seca do sistema radicular (MSSR) assim como a MSPA sofreram reduções significativas tendendo a zero com o aumento da dose de óleo essencial de *E. cinerea* (Figuras 10B, 11B e 12B).

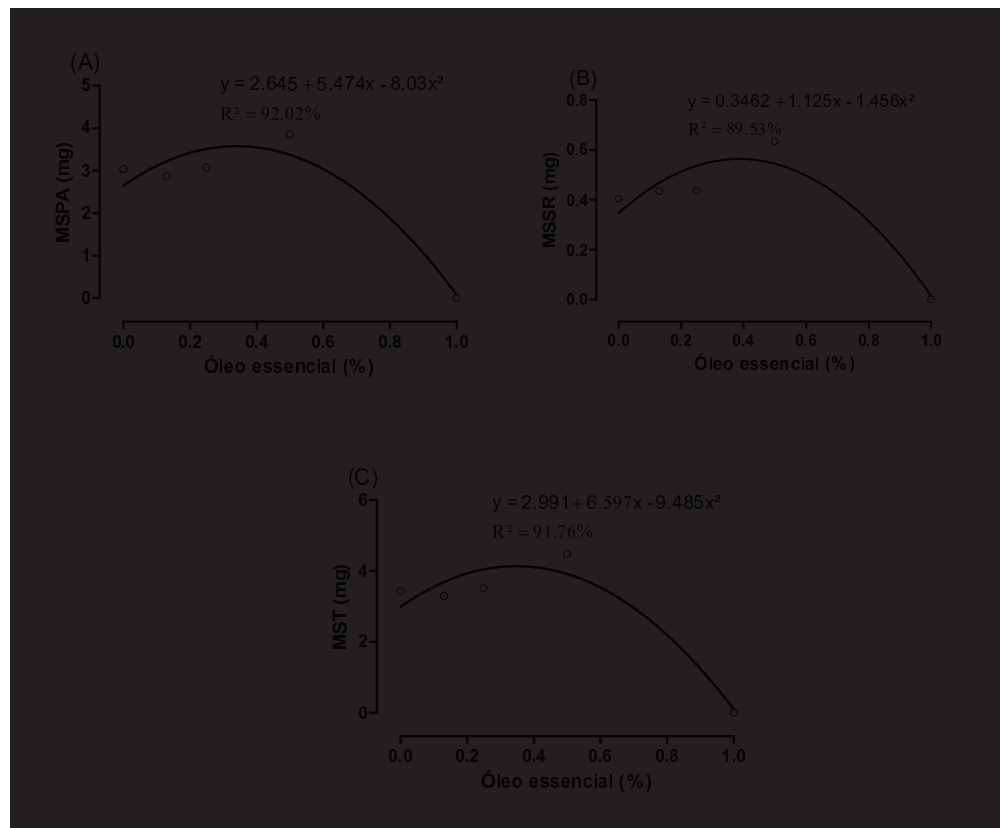


Figura 11 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MST) de *I. grandifolia*.

As massas secas totais (MST) das três espécies foram drasticamente inibidas pelo aumento da dose de óleo essencial de *E. cinerea* (Figuras 10C, 11C e 13C), indicando redução significativa no acúmulo de biomassa das plântulas. Isso sugere que injúrias celulares e/ou metabólicas podem ser acarretadas pelo óleo essencial (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007).

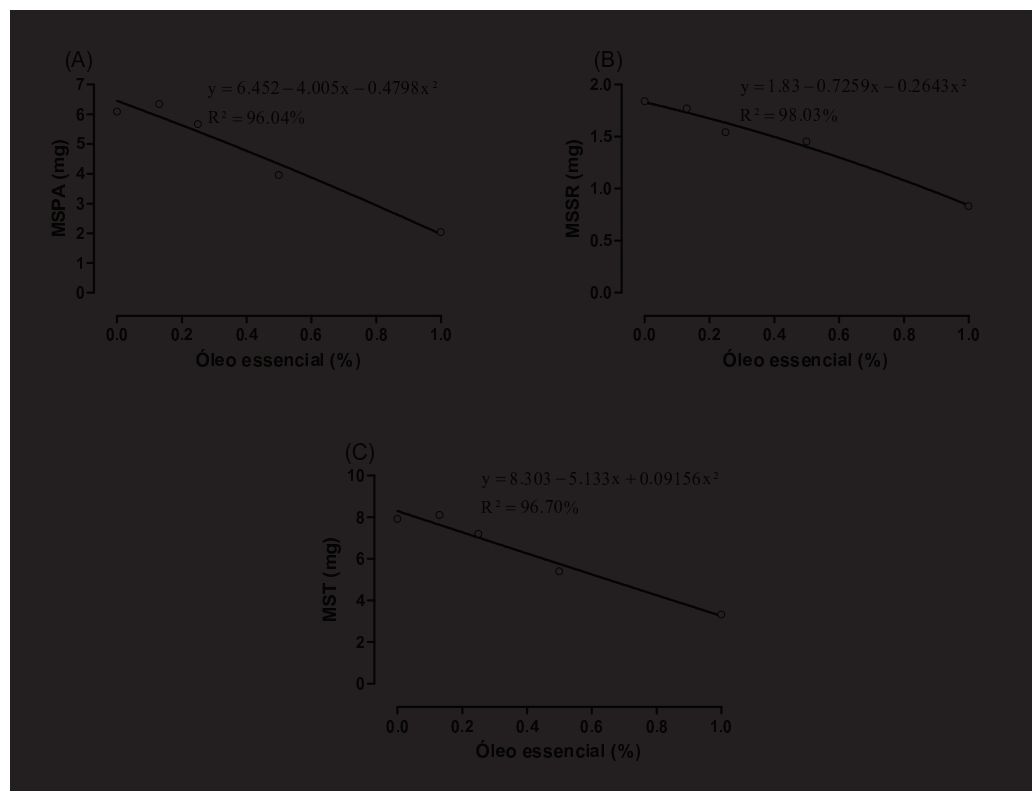


Figura 12 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MST) de *G. max*.

Os conteúdos de água das partes aéreas (CAPA) foram afetados significativamente nas três espécies estudadas (Figuras 13A, 14A e 15A). O conteúdo de água da raiz (CAR) foi afetado significativamente pelo óleo essencial e, conseqüentemente, o conteúdo de água total (CAT) da planta, indicando que os tecidos estavam menos hidratados e/ou mais lignificados pelo efeito alelopático (ZANARDO *ET AL.*, 2009).

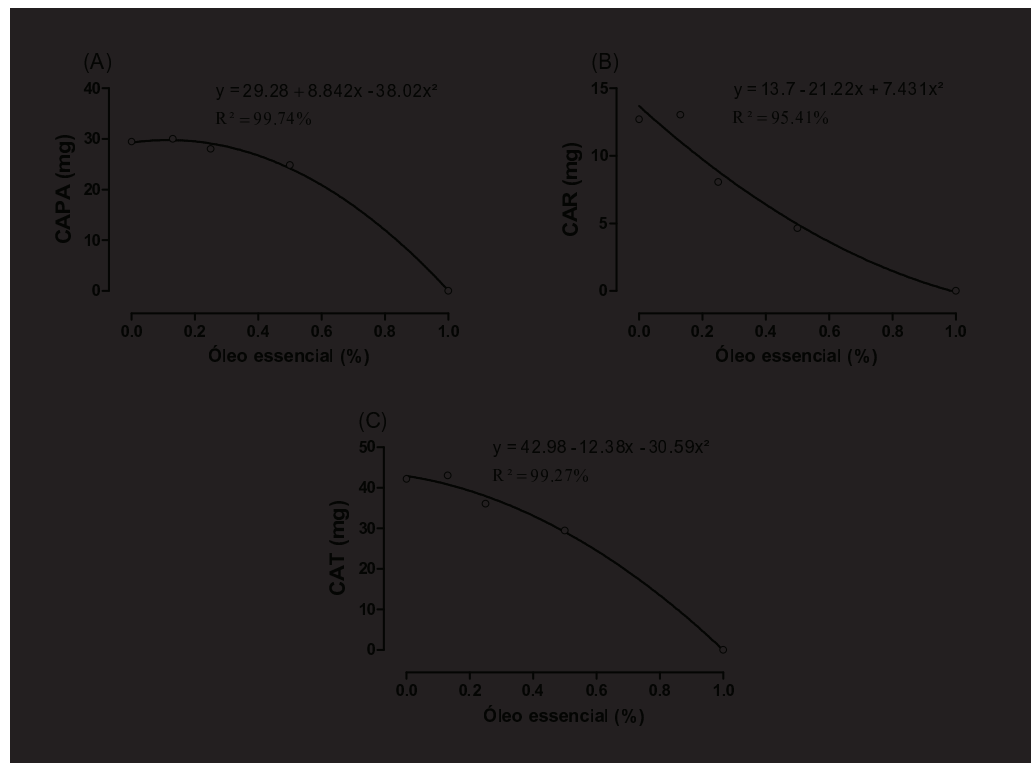


Figura 13 Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR) e conteúdo de água total (CAT) de *E. heterophylla*.



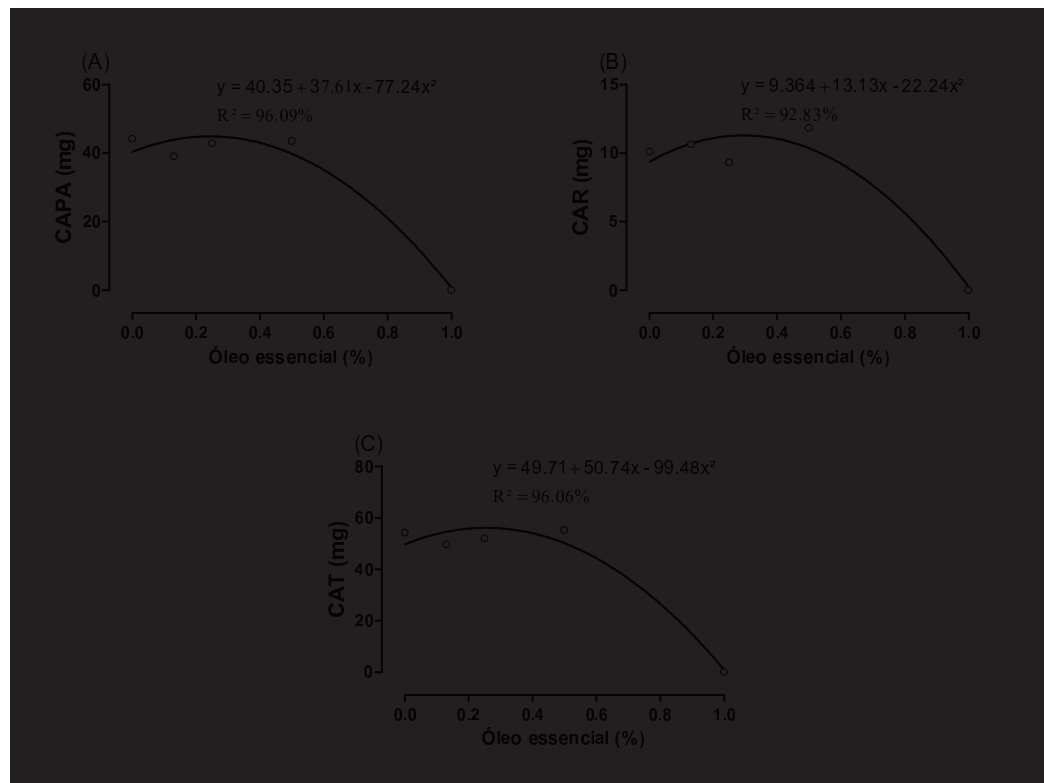


Figura 14 - Efeito do óleo essencial de *E cinerea* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR) e conteúdo de água total (CAT) de *I. grandifolia*.

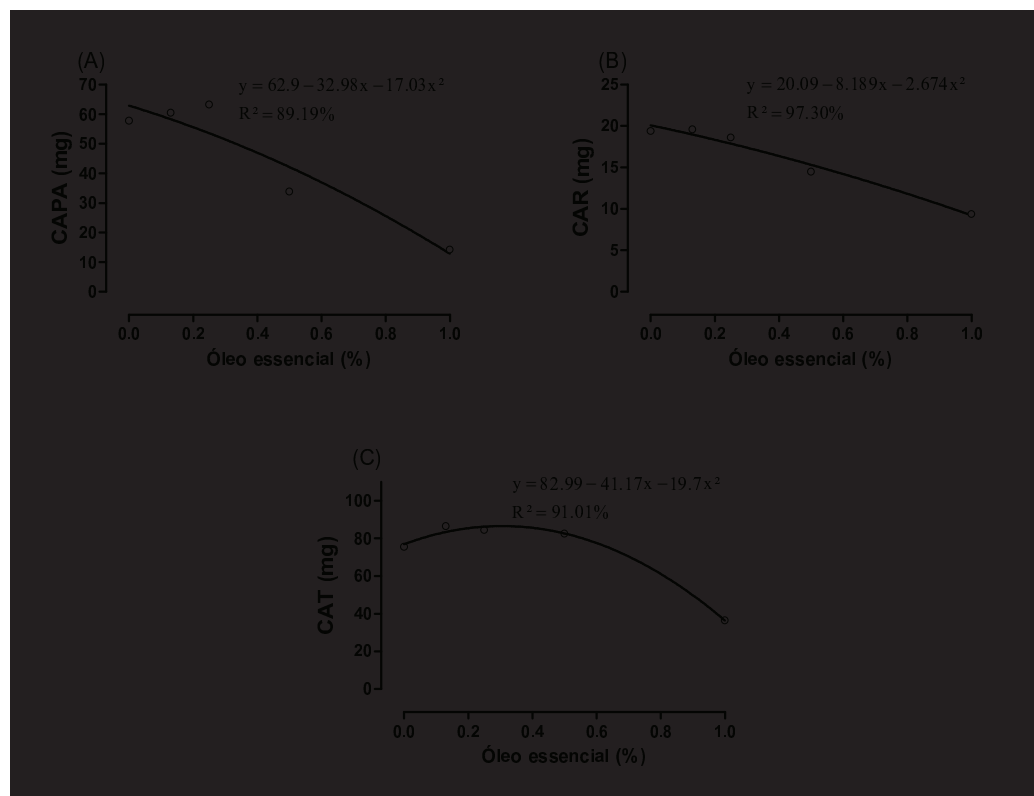


Figura 15 - Efeito do óleo essencial de *E. cinerea* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), teor de água da raiz (CAR) e teor de água total (CAT) de *G. max*.

## 5. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *E. cinerea* afetou negativamente a porcentagem de germinação (PGER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e índice de velocidade de germinação (IVG).

As variáveis biométricas de comprimento (CPA, CSSR, RPA/SR e CT) foram severamente afetadas com o aumento da dose de óleo essencial de *E. cinerea*.

As variáveis de massa fresca (MFPA, MFSR e MFT) e massa seca (MSPA, MSSR e MST), assim como os valores de conteúdo de água (CAPA, CAR e CAT), foram reduzidas significativamente com o aumento da dose de óleo essencial.

A *G. max* mostrou-se menos sensível ao óleo de *E. cinerea* nas doses testadas em praticamente todas as variáveis avaliadas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, D.; BRAGUINI, W. L.; KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 3, p. 611-624, 2000.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois, USA: Allured publishing corporation, 1995.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PIZZO, I. V.; SCHIAVETTO, A. R. Weed Response on Fusel Oil Applied at Initial and Late Post-Emergence. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 541-549, Jul-Sep 2010.
- BALDWIN, I. T.; PRESTON, C. A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, n. 2, p. 137-145, 1999.
- BATISH, D. R.; SETIA, N.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v. 23, n. 12, p. 1209-1214, 12// 2004.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R. K. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 61, n. 7-8, p. 465-471, 2006.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KOHLI, R. K.; KAUR, S.; YADAV, S. S. Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. **Agronomy for sustainable development**, v. 27, n. 3, p. 171-177, 2007.
- BRASIL. Soja em números (safra 2012/2013). 2014. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja/dados-economicos> >.
- CARRERO, C.; CEDEÑO, L.; QUINTERO, K.; PINO, H.; RODRÍGUEZ, L. Identificación y sensibilidad in vitro a fungicidas del agente causal de la pobredumbre del tallo en plántulas de *Eucalyptus cinerea* en Mérida, Venezuela. **Interciencia**, v. 28, n. 11, p. 656-659, 2003.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the Growth and Macronutrient Accumulation of Soybean. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2010.
- CARVALHO, R. B. Ocorrência de plantas nativas crescendo em uma área de reflorestamento por Pinus e Eucalyptus sem manejo comercial no município de Campina do Monte Alegre, SP. **Revista Eletrônica de Biologia** v. 3, n. 3, p. 53-74, 2011.

CAVALCA, P. A. M.; LOLIS, M. I. G. D. A.; REIS, B.; BONATO, C. M. Homeopathic and larvicide effect of *Eucalyptus cinerea* essential oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 835-843, 2010.

DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079-1089, 1999.

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

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 3, p. 191-194, 2005.

GELMINI, G. A.; FILHO, R. V.; NOVO, M. D. D. S.; ADORYAN, M. L. Resistence of *Euphorbia heterophylla* L. to ALS-inhibiting herbicides in soybean. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 452-457, Sep-Oct 2005.

GELMINI, G. A.; VICTÓRIA FILHO, R.; SOARES NOVO, M.; ADORYAN, M. L. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, v. 60, n. 2, p. 93-99, 2001.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L.; PIMENTEL, N. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 01, p. 23-28, 2009.

HE, H.; WANG, H.; FANG, C.; LIN, Y.; ZENG, C.; WU, L.; GUO, W.; LIN, W. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on *Echinochloa crus-galli*. **Weed research**, v. 49, n. 2, p. 183-192, 2009.

HUANG, J.; CARDOZA, Y. J.; SCHMELZ, E. A.; RAINA, R.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 767-775, 2003.

INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 325-331, 2004.

JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verlag Hamburg, 1998.

KERN, K. A.; PERGO, E. M.; KAGAMI, F. L.; ARRAES, L. S.; SERT, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11-12, p. 1095-1101, 2009.

KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Eucalypt oils for the control of *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus* L.). **Crop Protection**, v. 17, n. 2, p. 119-122, 1998.

- LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.
- LERDAU, M.; GRAY, D. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. **New Phytologist**, v. 157, n. 2, p. 199-211, 2003.
- LORBER, P.; MULLER, W. H. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany**, p. 196-200, 1976.
- LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. Nova Odessa: **Editora Plantarum** Ltda p. 339, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Regra para análise de sementes. . 395. 2009.
- MOORE, A.; DONAHUE, C. J.; BAUER, K. D.; MATHER, J. P. Simultaneous Measurement of Cell Cycle and Apoptotic Cell Death. In: JENNIE, P. M. e DAVID, B. (Ed.). **Methods in Cell Biology**: Academic Press, v. Volume 57, 1998.
- MORIANA, A.; VILLALOBOS, F.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 3, p. 395-405, 2002.
- NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187-1203, 2005.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest management science**, v. 67, n. 3, p. 341-351, 2011.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999.
- PERGO, É. M.; ABRAHIM, D.; DA SILVA, P. C. S.; KERN, K. A.; DA SILVA, L. J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E. L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 4, p. 499-507, 2008.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

- POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Manag Sci**, v. 64, n. 4, p. 360-5, 2008.
- RAI, V.; GUPTA, S.; SINGH, B. Volatile monoterpenes from *Prinsepia utilis* L. leaves inhibit stomatal opening in *Vicia faba* L. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 1, p. 121-124, 2003.
- REIGOSA, R.; JOAQUÍN, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. S. Allelopathy : a physiological process with ecological implications. **Dordrecht, Netherlands**: Springer, 2006.
- REIS, B. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L. Merrill, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L.. Programa de pós graduação em agronomia, Universidade Estadual de Maringá, [http://www.pga.uem.br/uploads/teses\\_253\\_0b7R3Haf4fMEbEjkW7oN9SbWp.pdf](http://www.pga.uem.br/uploads/teses_253_0b7R3Haf4fMEbEjkW7oN9SbWp.pdf). (dissertação) 2011.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.
- ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 1, p. 303-313, 2000.
- ROSADO, L.; RODRIGUES, H.; PINTO, J.; CUSTÓDIO, T.; PINTO, L.; BERTOLUCCI, S. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço “Maria Bonita” na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 422-428, 2009.
- ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proceedings of the National **Academy of Sciences of the United States of America**, v. 55, n. 1, p. 134, 1966.
- SALAMCI, E.; KORDALI, S.; KOTAN, R.; CAKIR, A.; KAYA, Y. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 9, p. 569-581, 2007.
- SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 295-306, 2003.
- SETIA, N.; BATISH, D.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 63-67, 2007.
- SINGH, H.; BATISH, D.; SETIA, N.; KOHLI, R. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of applied biology**, v. 146, n. 1, p. 89-94, 2005.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K.  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2006.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R. K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 2, p. 111-116, 2002.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 347-350, 2002.

STEENHUISEN, S. L.; RAGUSO, R. A.; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, 2012.

SVENSSON, G. P.; PELLMYR, O.; RAGUSO, R. A. Pollinator attraction to volatiles from virgin and pollinated host flowers in a yucca/moth obligate mutualism. **Oikos**, v. 120, n. 10, p. 1577-1583, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 5th Ed. 782p, 2012.

THEIS, N.; RAGUSO, R. A. The effect of pollination on floral fragrance in thistles. **J Chem Ecol**, v. 31, n. 11, 2005.

TREZZI, M. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, n. 5, p. 1075-1082, 2009.

UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2009.

VICKERS, C. E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M. T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 5, p. 283-291, 2009.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: II – Distribuição geográfica e caracterização genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **Agrociência**, v. 10, p. 461-465, 2004.

WILEY-REGISTRY. 8th Edition with NIST 05 MS Spectra, Revision 2005 D.06.00, Agilent Technologies. 2007.

ZANARDO, D. I. L.; LIMA, R. B.; FERRARESE, M. D. L. L.; BUBNA, G. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 25-30, 2009.

## CAPÍTULO 2

EFEITO DOS MONOTERPENOS CITRONELOL, CITRONELOLAL E  
GERANIOL SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE  
*Euphorbia heterophylla* L



## ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the effect on germination, early growth, synergistic and/or antagonistic among terpenoids as well as its influence on biomass and control in early post-emergence of *E. heterophylla*. The seeds were placed in petri dishes and pots and submitted to different concentrations of essential oil of citronella, citronellal, geraniol and citronellol, and mixtures thereof (from 0 to 6%, with 1.5 or 2% DMSO v/v) the petri dishes were placed in BOD and 25°C for 7 days with a photoperiod of 12 hours and the vases in the greenhouse. LD50, germination percentage (PGER), mean germination time (TMG), germination average speed (VMG), germination speed index (IVG), shoot length (CPA), length of the root system (CSR), total length (CT), ratio length of the shoot / root part (RPA/SR), shoot dry mass (MSPA), root dry mass (MSSR) , total dry mass (MST), percentage of live plants (%PVIVAS), percentage of control (%CONTROL), percentage of viable plants (%PVIAVEIS). Data were submitted to ANOVA and quantitative variables analyzed by polynomial regression and Scott-Knott test at 5% probability. All variables were severely affected. The germinative variables PGER, TMG, VMG and IVG were severely affected with the increasing dose of essential oil and monoterpenes, as well as their respective mixtures. A mixture of geraniol and citronellal showed antagonistic effect, increasing the LD50 value of the germinatives variables when compared to the values of LD50 of pure geraniol. The growth variables CPA, CSR, CT and RPA / SR as well as MSPA, MSSR and MST were significantly affected with increasing doses of monoterpenes. The %PVIVAS, %PVIAVEIS and %CONTROL were affected with the application of monoterpenes in early post-emergence. Generally terpenes significantly affected all variables evaluated, completely inhibiting germination and growth. It was also noted the death of seedlings of *E. heterophylla* enabling the control in early post-emergence application of monoterpenes with potted. Thus, the essential oil of citronella and monoterpenes citronellal, citronellol and geraniol have great potential for use as bioherbicide. However, there is need for more detailed in metabolic level and field level to definitive conclusions can be obtained from studies.

Keywords: Allelopathy. Weed. Citronela. Monoterpenes.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de monoterpenos no processo germinativo, crescimento inicial, efeito sinérgico ou antagônico entre os terpenoides, assim como sua influência na biomassa e controle em pós-emergência inicial de *E. heterophylla*. As sementes foram dispostas em placa de Petri e em vasos e, então, submetidas às diferentes concentrações de óleo essencial de citronela, citronelol, geraniol e citronelal e suas misturas (0 a 6%, com 1,5 ou 2% de DMSO v/v). As placas de petri foram acondicionadas em câmara BOD (demanda biológica de oxigênio) a 25°C por 7 dias e fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos com vasos foram conduzidos em casa de vegetação. Foram determinadas as seguintes variáveis: DL<sub>50</sub> (dose letal média), porcentagem de germinação (PGER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR), massa seca total (MST), porcentagem de plantas vivas (%PVIVAS), porcentagem de controle (%CONTROLE) e porcentagem de plantas viáveis (%PVIAVEIS). Os dados foram submetidos à ANOVA e as variáveis quantitativas analisadas por regressão polinomial e teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as variáveis foram severamente afetadas pelos tratamentos. As variáveis germinativas PGER, TMG, VMG e IVG foram afetadas com o aumento da dose do óleo essencial e dos monoterpenos, assim como de suas respectivas misturas. A mistura de citronelal e geraniol apresentou efeito antagônico, aumentando o valor da DL<sub>50</sub> das variáveis de germinação quando comparadas aos valores da DL<sub>50</sub> do geraniol puro. As variáveis de crescimento CPA, CSR, CT e RPA/SR, assim como de MSPA, MSSR e MST, foram afetados significativamente com o aumento das doses dos monoterpenos. A %PVIVAS, %PVIAVEIS e %CONTROLE foram afetadas com a aplicação dos monoterpenos em pós-emergência inicial. De maneira geral, os terpenos afetaram significativamente todas as variáveis avaliadas, inibindo a germinação e crescimento. Também foi constatada a morte de plântulas de *E. heterophylla*, possibilitando seu controle em pós-emergência inicial com a aplicação dos monoterpenos em vaso. Assim, o óleo essencial de citronela e os monoterpenos citronelal, geraniol e citronelol possuem grande potencial para serem utilizados como bioherbicidas. Entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados, em nível metabólico e em campo para que conclusões definitivas possam ser obtidas.

Palavras-chave: Alelopatia. Planta daninha. Citronela. Monoterpenos.

## 1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais o uso rotineiro e indiscriminado de herbicidas sintéticos tem gerado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, gerarem risco para a fauna silvestre e contaminarem os alimentos que entram na dieta humana. Há necessidade de superar os paradigmas a respeito do controle de plantas daninhas, buscando métodos que sejam eficientes no controle e que respeitem os interesses da sociedade e os recursos naturais (GRANA *ET AL.*, 2012).

Dentre todos os fatores que reduzem a produtividade desta e outras culturas, as plantas daninhas certamente encontram-se entre as maiores causas de redução da produtividade, podendo representar mais de 25% do custo de produção para o controle. Dentre as plantas daninhas mais significativas na redução da produtividade de soja no estado do Paraná, encontra-se a *Euphorbia heterophylla*, que pode reduzir em 22% a produtividade, principalmente pelo difícil controle empregado e pelas perdas ocasionadas a cultura (MOORE *ET AL.*, 1998).

Os herbicidas representam 45% do total dos agrotóxicos comercializados no Brasil, representando 19% do consumo mundial de agrotóxicos em 2010 (MOORE *ET AL.*, 1998), fazendo com que o Brasil desponte na lista de maiores consumidores de agrotóxicos per capita do mundo com 5,2 kg por habitante, que representa 9 bilhões de dólares (SENADO, 2012).

Os casos de resistência das plantas daninhas aliados à utilização indiscriminada de um ou alguns herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, dificultam cada vez mais o controle destas plantas daninhas, que pode acarretar em significativo aumento no custo de produção da cultura. A utilização de um único mecanismo de ação seleciona indivíduos resistentes (EMBRAPA, 2012). O surgimento de biótipos de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da enzima ALS (aceto lactato sintase) e ao glifosato (inibidor da EPSPs (5 enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase)) já foi identificado, dificultando o controle químico desta planta daninha (EMBRAPA, 2012).

A resistência aos princípios ativos largamente utilizados como o glifosato está relacionada à utilização da soja transgênica resistente ao glifosato (Soja Roundup Ready), que, devido à pressão de seleção gerada pela utilização contínua de uma única molécula, seleciona populações resistentes de diversas espécies ao redor do mundo (POWLES, 2008).

Apesar dos estudos já realizados, não se encontram na literatura informações mais detalhadas sobre o efeito dos monoterpênicos citronelal, geraniol e citronelol e seu mecanismo

de ação em plantas daninhas de importância agrícola no Brasil. Desta forma, o estudo dos monoterpênicos, na germinação, crescimento e mesmo no metabolismo fotossintético pode auxiliar sobremaneira o entendimento da ação destes compostos em inibir a germinação e/ou crescimento de plantas invasoras de interesse para a agricultura brasileira. Além disso, este estudo pode fornecer subsídio para a substituição dos atuais herbicidas, com menor impacto ambiental.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito no processo germinativo, crescimento inicial, efeito aditivo, sinérgico ou antagônico entre os terpenóides, assim como sua influência na biomassa e controle em pós-emergência inicial de *E. heterophylla*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que possuem função direta no crescimento e desenvolvimento, conhecidos como metabólitos secundários. Geralmente estes metabólitos influenciam os processos de respiração, fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os metabólitos secundários também se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita dentre os vegetais, podendo restringir-se a uma única espécie. Isto não ocorre com os metabólitos primários que podem ser encontrados em todo o reino vegetal. Os estudos sobre os metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, visando à obtenção e identificação de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e utilização em indústrias (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Pesquisas recentes atribuem principalmente aos metabólitos secundários funções ecológicas importantes para os vegetais, como proteção contra herbivoria e infecções por micro-organismos patogênicos, atuação como atrativos para a polinização e dispersão de sementes, atuação na competição planta-planta e simbiose planta-micro-organismo. Os terpenóides constituem a maior classe de produtos secundários (DUDAI *ET AL.*, 1999). Os terpenóides são biosintetizados pela rota do ácido mevalônico a partir de três moléculas de acetil CoA, após uma série de reações produz isopentenil difosfato (IPP), através da rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre no cloroplasto e outros plastídios. A partir de gliceraldeído 3-fosfato e piruvato, através de uma série de reações, produz dimetialil difosfato (DMAPP). O IPP e seu isômero DMAPP são moléculas básicas na formação dos terpenóides, tais compostos contendo 5 carbonos reagem formando geranyl difosfato (GPP) (C<sub>10</sub>), molécula

que origina quase todos os monoterpenos conhecidos. A adição de mais um IPP ou DMAPP produz farnesil difosfato (C<sub>15</sub>), precursor da maioria dos sesquiterpenos (PARÉ E TUMLINSON, 1999; VICKERS *ET AL.*, 2009; LUIZA ISHII-IWAMOTO *ET AL.*, 2012; TAIZ E ZEIGER, 2012).

A partir do geranil difosfato (GPP), precursor de quase todos os monoterpenos, a enzima geraniol sintase produz geraniol (álcool) (BAIRD *ET AL.*, 2014), que é convertido diretamente em citronelol (álcool), que por sua vez sofre oxidação para formar citronelal (aldeído) em *Cymbopogon winterianus*. Não há evidências de que o citronelol é convertido em geraniol, e não existem enzimas ativas para conversão de aldeídos (citronelal) de volta a álcoois (citronelol e geraniol) nessa espécie de planta (AKHILA, 1986).

Os monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, e suas infinitas misturas, constituem os óleos essenciais, que conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade, repelindo potenciais herbívoros (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Os terpenoides possuem funções importantes na vida das plantas agindo como atrativos de polinizadores (PICHERSKY E GERSHENZON, 2002; THEIS E RAGUSO, 2005; SVENSSON *ET AL.*, 2011; STEENHUISEN *ET AL.*, 2012), atuando na sinalização em resposta aos patógenos (HUANG *ET AL.*, 2003; LERDAU E GRAY, 2003), sinalização em resposta ao ataque de herbívoros (BALDWIN E PRESTON, 1999; PARÉ E TUMLINSON, 1999; SCHMELZ *ET AL.*, 2003), atrativo de inimigos naturais de herbívoros (PARÉ E TUMLINSON, 1999; UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação repelente contra herbívoros (UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação inseticida (LABINAS E CROCOMO, 2002), ação bactericida (INOUE *ET AL.*, 2004), ação nematocida (NTALLI *ET AL.*, 2010; NTALLI *ET AL.*, 2011), e em resposta aos estresses abióticos (VICKERS *ET AL.*, 2009). Outro efeito importante dos terpenoides é seu efeito alelopático sobre as plantas, apresentando inibição da germinação e crescimento (ROMAGNI *ET AL.*, 2000; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2007), redução do teor de clorofila (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2006; SETIA *ET AL.*, 2007), redução da respiração (ABRAHIM *ET AL.*, 2000; SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002), redução da mitose (ROMAGNI *ET AL.*, 2000), quebra da integridade da membrana celular (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007), inibição da abertura estomática (RAI *ET AL.*, 2003), inibição da síntese de DNA (NISHIDA *ET AL.*, 2005) além de causar estresse oxidativo (SINGH *ET AL.*, 2006; HE *ET AL.*, 2009) e injúrias foliares (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico e reagentes

As sementes de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim bravo) foram obtidas da empresa Cosmos® de São Paulo, armazenadas em dessecador e acondicionadas em geladeira.

Os monoterpenos isolados foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich® com pureza de 95% para citronelol e citronelal e 98% para o geraniol.

O óleo essencial de citronela foi adquirido de uma propriedade especializada na obtenção de óleos essenciais (por arraste de vapor) localizada em Marilândia do Sul – PR.

#### 3.2. Local dos experimentos

Os experimentos de germinação foram realizados no Laboratório de Homeopatia e Fisiologia Vegetal e os experimentos em vaso foram realizados em casa de vegetação pertencente ao mesmo laboratório na Universidade Estadual de Maringá – PR.

#### 3.3. Método de germinação

As sementes de *E. heterophylla* L. foram lavadas em água corrente, esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos e lavadas com água destilada por 6 vezes. Cinquenta sementes foram dispostas em placa de Petri revestida com duas folhas de papel *germitest* previamente autoclavadas e umedecidas com 10 mL de casa solução, separadamente.

Os tratamentos foram constituídos de cinco concentrações de citronelol, citronelal e geraniol referentes àquelas encontradas de cada monoterpeno no óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) (Tabela 1) referentes a 0,015, 0,03, 0,06, 0,12 e 0,25% (v/v) de óleo de citronela diluídos em dimetilsulfoxido (DMSO) (2%, v/v). Os controles foram constituídos de água destilada pura e água destilada com DMSO (2%, v/v).

As placas foram dispostas de forma aleatória em câmara de germinação tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas de luz a 25 °C por 7 dias.

### 3.4. Determinação das variáveis de germinação

As variáveis de germinação foram determinadas de 12 em 12h (0 a 132h) após a semeadura. Contaram-se as sementes germinadas para os cálculos das variáveis de germinação, sendo consideradas germinadas as sementes com radícula igual ou superior a 2 mm.

As variáveis determinadas foram: porcentagem de germinação (PGER [%]), tempo médio de germinação (TMG [h]), velocidade média de germinação (VMG [h]), índice de velocidade de germinação (IVG) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

#### 3.4.1. Porcentagem de germinação (PGER)

$$PGER = (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$$

Em que  $\sum n_i$  é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinar (N), expresso em porcentagem;

#### 3.4.2. Tempo Médio de Germinação (TMG)

$$TMG = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$$

Em que  $n_i$  é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo  $t_{i-1}$  e  $t_i$ , expresso em horas.

#### 3.4.3. Velocidade Média de Germinação (VMG)

É o inverso de TMG, expresso em horas.

$$VMG = \sum n_i / \sum n_i \cdot t_i$$

#### 3.4.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots + Gn / Nn$$

Em que G1, G2.... Gn é o número de sementes germinadas e N1, N2,...,Nn é o número de horas após a semeadura.



### 3.5. Experimento de crescimento

As sementes de *E. heterophylla* L. foram lavadas em água corrente, esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos e lavadas com água destilada por 6 vezes. Aproximadamente 2000 sementes foram dispostas em bandeja plástica revestida com duas folhas de papel *germitest* previamente autoclavadas e umedecidas com água, as bandejas foram embaladas com filme PCV para evitar contaminação e acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*), com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25 °C por 24 horas.

As plântulas previamente germinadas foram selecionadas quanto ao tamanho e uniformidade e, então, dispostas em placas de Petri contendo solução de DMSO (1,5% v/v) com citronelol (0,001, 0,003, 0,005, 0,01, 0,015 e 0,02% (v/v)), citronelal (0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 e 0,07% (v/v)), geraniol (0,001, 0,003, 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025 e 0,03% (v/v)) e controles constituídos de água destilada e DMSO (1,5%). As placas foram dispostas de forma aleatória em câmara de germinação tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*), com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25 °C por 9 dias.

As variáveis analisadas foram comprimento da parte aérea (CPA [cm]), comprimento do sistema radicular (CSR [cm]), comprimento total (CT [cm]), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa seca da parte aérea (MSPA [mg]), massa seca do sistema radicular (MSSR [mg]) e massa seca total (MST [mg]) (FERREIRA E BORGHETTI, 2004; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009).

#### 3.5.1. Razão parte aérea sistema radicular (RPA/SR)

$$RPA/SR = CPA/CSR$$

Onde CPA é o comprimento da parte aérea e CSR é o comprimento do sistema radicular.

#### 3.5.2. Massa seca (MS)

A massa seca foi obtida após a secagem (massa constante) das partes das plântulas em estufa a 70°C com auxílio de balança analítica.

3.6. Experimentos de avaliação do efeito herbicida dos terpenoides em pós emergência inicial.

Semeou-se aproximadamente 30 sementes de *E. heterophylla* em vasos de 2L contendo substrato comercial para germinação contendo vermiculita. Realizou-se desbaste para uniformizar o tamanho das plântulas deixando-se apenas 10 plantas por vaso. Quando as plantas apresentavam 2 folhas (pós-emergência inicial (LORENZI, HARRI, 2006)), pulverizou-se 0,8mL em cada unidade experimental (vaso). Cada tratamento consistiu de um terpenoide dissolvido em solução contendo água e DMSO (1,5%, v/v), as doses para citronelol, citronelal e geraniol utilizadas foram de 1, 2, 4 e 6% (v/v) e controles contendo DMSO 2% e água pura.

As variáveis porcentagem de plantas vivas (%PVIVAS) representa a porcentagem de plantas que apresentavam pelo menos uma parte viva 8 dias após a aplicação dos tratamentos. A porcentagem de controle (%CONTROLE) representa a porcentagem de plantas mortas 8 dias após a aplicação dos tratamentos e a porcentagem de plantas viáveis (%PVIÁVEIS) representa a porcentagem de plantas que apresentavam folhas novas 8 dias após a aplicação dos tratamentos.

### 3.7. Análise do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

A análise foi realizada em parceria com a Universidade de Coimbra por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). A análise de GC foi realizada no equipamento Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), com sistema de tratamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.05.04 equipado com um único injetor e dois detectores de ionização de chama (FID). Um divisor Grapapak (Agilent Technologies, part no. 5021-7148) foi usado para amostragem simultânea em duas colunas (Supelco, Bellefonte, PA, USA), com coluna capilar de sílica fundida contendo diferentes fases estacionárias (SPB-1 (polydimethylsiloxane) 30m × 0,20mm i.d., espessura de filme de 0,20 m), e SupelcoWax-10 (polyethyleneglycol 30m × 0,20mm i.d., espessura de filme de 0,20 m). Programa de temperatura do forno de 70 – 220 °C (3 °C.min<sup>-1</sup>), 220°C (15 min); temperatura do injetor de 250°C; como gás veículo foi utilizado o hélio, ajustado a velocidade linear de 30 cm s<sup>-1</sup>, razão de divisão 1:40, temperatura dos detectores de 250°C.

A CG/MS foi realizada no aparelho Hewlett-Packard 6890 cromatógrafo a gás equipado com coluna de sílica fundida HP1 (polidimetilsiloxano 30, x 0,25mm i.d., espessura do filme de 0,25 m) acoplado a um detector de massa seletiva Hellett-Packard 5973 (Agilent Technologies) operados por software ChemStation avançado HP, versão A.03.00. GC com parâmetros como descrito acima, temperatura de interface de 250 °C. MS quádruplo, com temperatura de 150°C, energia de ionização de 70 eV, ionização atual de 60 A, intervalo de varredura de 35-250 unidades, scans 1: 4,51.

Os componentes do óleo essencial foram identificados por seus índices de retenção em ambos os SPB-1 e Supelcowax-10 colunas e do seu espectro de massa. Os índices de retenção foram calculados por interpolação linear em relação aos tempos de retenção de C8-C23 de *n*-alcanos. Os resultados foram comparados com as amostras de referência incluídos no banco de dados do laboratório da C.E.F.- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os espectros de massa adquiridos foram comparados com espectros de referência do banco de dados do laboratório, banco de dados Wiley / NIST library (WILEY-REGISTRY, 2007) e dados da literatura (ADAMS, 1995; JOULAIN E KÖNIG, 1998). As quantidades relativas de cada componente foram calculadas baseadas na área dos dados brutos de GC, sem fator de correção.

### 3.8. Delineamento estatístico

#### 3.8.1. Experimentos de germinação e crescimento

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA e as variáveis significativas analisadas por regressão polinomial com nível de significância de 5% pelo programa SISVAR (5.1). Os gráficos foram obtidos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

#### 3.8.2. Experimentos de interação

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias analisadas por regressão polinomial com nível de significância de 5% pelo programa SISVAR (5.1). Os gráficos foram obtidos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

Os dados de cada repetição foram analisados por regressão linear simples e com a equação obtida calculou-se as DL<sub>50</sub> como a metade do valor do controle referente a DMSO 1,5%. Os quatro valores, referentes às quatro repetições, encontrados foram analisados pelo teste Scott-Knott com nível de significância de 5% pelo programa SISVAR (5.1).

### 3.8.2. Experimentos em vaso

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA e as variáveis significativas analisadas por regressão polinomial com nível de significância de 5% pelo programa SISVAR (5.1). Os gráficos foram obtidos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Composição do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

Observa-se que os componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* analisado são citronelal (32,4%), geraniol (23,9%), citronelol (14,6%), geranial (3,6%), limoneno (3,3%) e neral (3,1%) (Tabela 1). Tais resultados assemelham-se aos descritos por Quintans-Júnior *et al.* (2008) que descreve os componentes majoritários do óleo essencial de *C. winterianus* como sendo o geraniol (40,06%), citronelal (27,44%) e citronelol (10,45%) e por Martins (2006) citronelal (41,4%), geraniol (17,9%) e citronelol (17,28%).

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* avaliado por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).

<b>Composição do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i></b>	
<b>Composto</b>	<b>%</b>
Citronelal	32,4
Geraniol	23,9
Citronelol	14,6
Geranial	3,6
Limoneno	3,3
Neral	3,1
Outros compostos	17,0
Total de compostos identificados	94,6%

O citronelal e citronelol são os componentes majoritários do eucalipto citriodora. Quando analisado o óleo extraído estágio vegetativo, o citronelal representa 77,67% do óleo seguido pelo citronelol com 12,17%. Quando o óleo foi extraído das plantas adultas, sua composição variou pouco, apresentando 48,33% de citronelal e 21,87% de citronelol (BATISH ET AL., 2006). O citronelol e geraniol podem ser encontrados como componentes majoritários do óleo essencial de *Rosa damascena* Mill e de gerânio e outras espécies do gênero *Pelargonium* (RAJESWARA RAO ET AL., 2002).

#### 4.2. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação

Os resultados obtidos através dos experimentos de germinação demonstram que o óleo essencial de *C. winterianus*, seus compostos majoritários (citronelal, geraniol e citronelol), assim como suas misturas, afetaram significativamente todas as variáveis de germinação analisadas de *E. heterophylla* (Figuras 1 a 8).

O óleo essencial de *C. winterianus* reduziu significativamente a porcentagem de germinação (PGER), inibindo totalmente a germinação com 2500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 1A). Resultados similares foram observados por Reis (2011), que observou inibição total da germinação do óleo essencial de *C. winterianus* em doses de 0,25% (v/v) da mesma espécie estudada.

A variável velocidade média de germinação (VMG) foi drasticamente afetada pelo aumento da concentração de óleo de *C. winterianus* (Figura 1B). Similarmente ao aumento significativo do tempo médio de germinação (TMG), o efeito do óleo essencial, reduzindo a VMG e, conseqüentemente, aumentando TMG, reduz a capacidade competitiva das plantas por deixar a semente mais exposta ao ataque de patógenos presentes no solo, além de reduzir a capacidade competitiva com plantas que germinaram mais rápido e encontram-se em estágio fenológico mais avançado (FERREIRA E BORGHETTI, 2004).

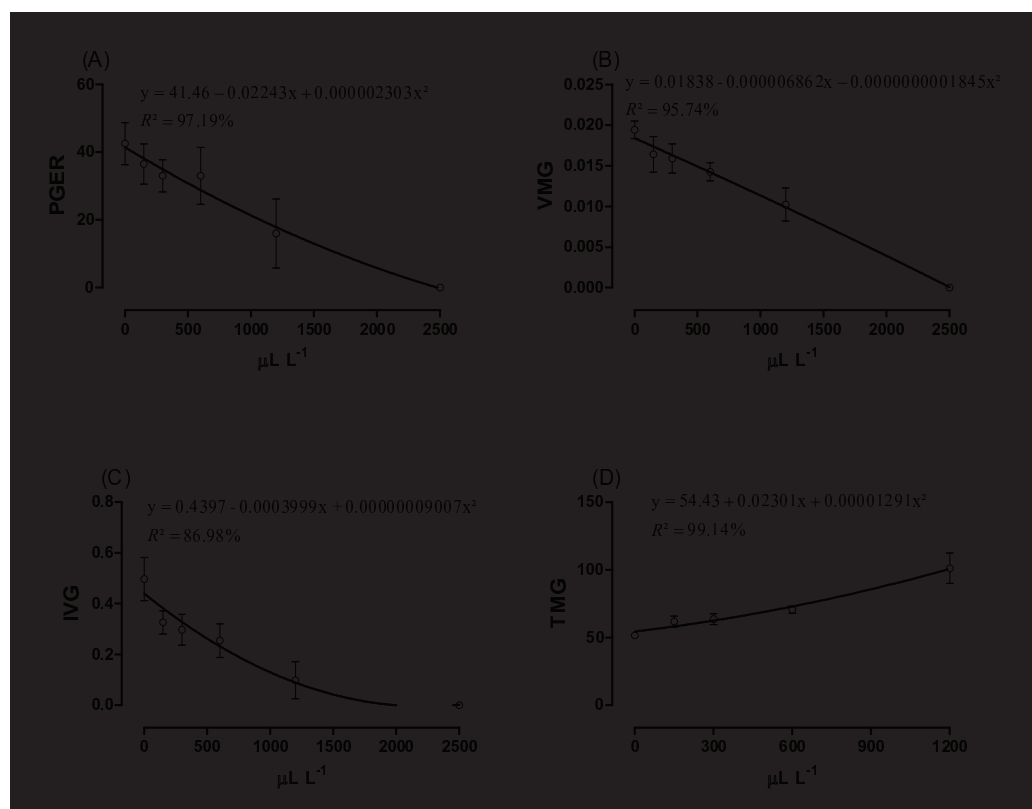


Figura 1 –Efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

O índice de velocidade de germinação (IVG) (Figura 1C), assim como as demais variáveis germinativas, foram afetados significativamente pelo aumento da concentração de óleo essencial, tendendo a zero em concentrações próximas de  $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ .

Observa-se que as mesmas variáveis influenciadas pelo óleo essencial de *C. winterianus* foram também afetadas pelo seu constituinte majoritário. O citronelal afetou significativamente a PGER, levando a valores muito próximos de zero em concentrações próximas a  $1600 \mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 2A).

Os valores de VMG e TMG, assemelhando-se aos resultados do óleo essencial de *C. winterianus*, foram significativamente influenciados pelo aumento da concentração de citronelal (Figura 2B e D).

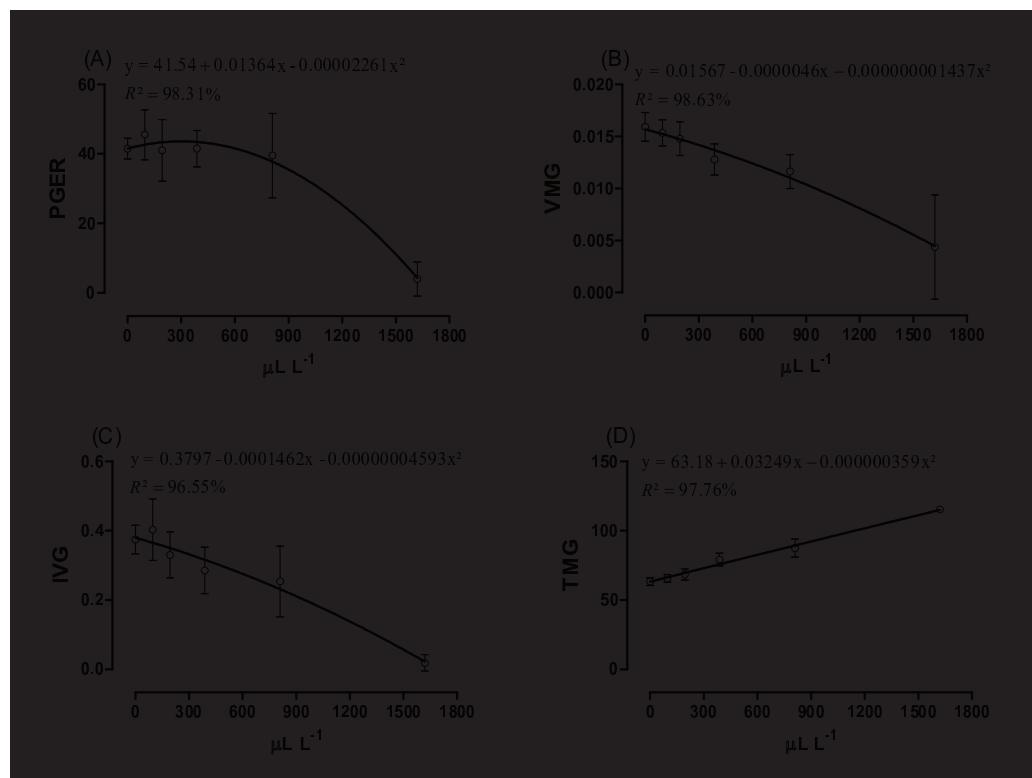


Figura 2 –Efeito do citronelal na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

O IVG foi inibido aos valores próximos de zero em concentrações próximas de 1600  $\mu\text{L L}^{-1}$ , assemelhando-se a concentração de óleo essencial de *C. winterianus*.

O geraniol inibiu totalmente a PGER de *E. heretophylla* (Figura 3A) em doses de aproximadamente 1.100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , sendo mais efetivo na inibição da germinação que o óleo essencial de *C. winterianus*.

Os valores da VMG foram significativamente afetados pelo aumento da concentração de geraniol (Figura 3B), atingindo valores muito próximos de zero em doses de 1200  $\mu\text{L L}^{-1}$ , sendo equivalente à metade da dose necessária para inibição da VMG pelo óleo essencial de *C. winterianus* (Figura 1B).

Os valores de TMG foram influenciados significativamente pelo aumento das doses de geraniol (Figura 3D), indicando que foi necessário maior tempo para germinação de *E. heterophylla*, assim como para o citronelal e óleo essencial de *C. winterianus* (Figuras 1D e 2D).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi significativamente inibido pelo geraniol. Os valores do IVG se aproximaram de zero em doses de aproximadamente 1100  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 3C), menor que os 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial de *C. winterianus* e 1600  $\mu\text{L L}^{-1}$  de citrônella, indicando que o geraniol apresenta maior efeito inibitório que o óleo essencial de *C. winterianus* e citrônella.

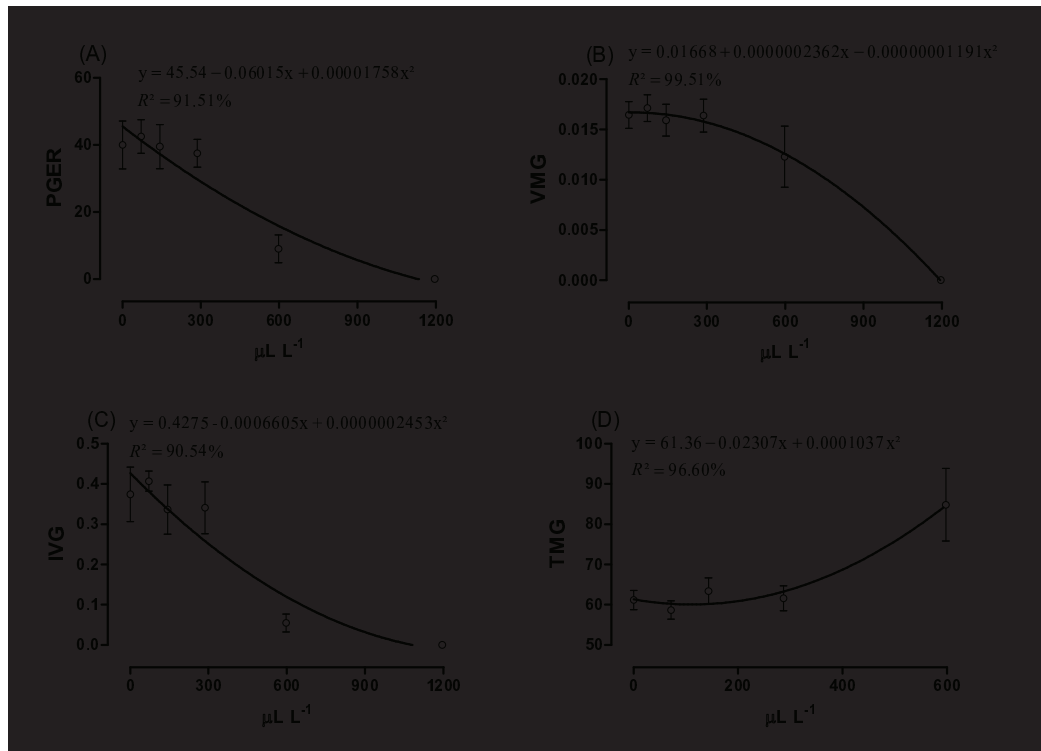


Figura 3 –Efeito do geraniol na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

O citrônella apresentou grande eficiência na inibição total da porcentagem de germinação (750  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) quando comparada ao citrônella (1600  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), geraniol (1100  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e óleo essencial de *C. winterianus* (2500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (Figuras 1A a 4A). Tal resultado abre discussão ao possível efeito sinérgico e/ou antagônico dos terpenoides que constituem os óleos essenciais.

A velocidade média de germinação (VMG) foi significativamente afetada pelo aumento de concentração de citrônella (Figura 4B). Na concentração de 750  $\mu\text{L L}^{-1}$ , os valores aproximam-se de zero. Quando comparamos os resultados do citrônella aos



encontrados em óleo essencial (2500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e geraniol (1200  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), evidencia-se o maior efeito inibitório sobre a variável VMG de *E. heterophylla*.

O tempo médio de germinação (TMG) também foi influenciado significativamente pelo aumento das doses de citronelol (Figura 4D), assemelhando-se aos resultados do óleo essencial, citronelal e geraniol (Figuras 1D a 3D).

O índice de velocidade de germinação (IVG) apresentou valores próximos de zero em doses de aproximadamente 750  $\mu\text{L L}^{-1}$ , que, se comparada as doses de óleo essencial (2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), citronelal (1600  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e geraniol (1100  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (Figuras 1C, 2C e 3C), mais uma vez demonstra o potencial alelopático do citronelol.

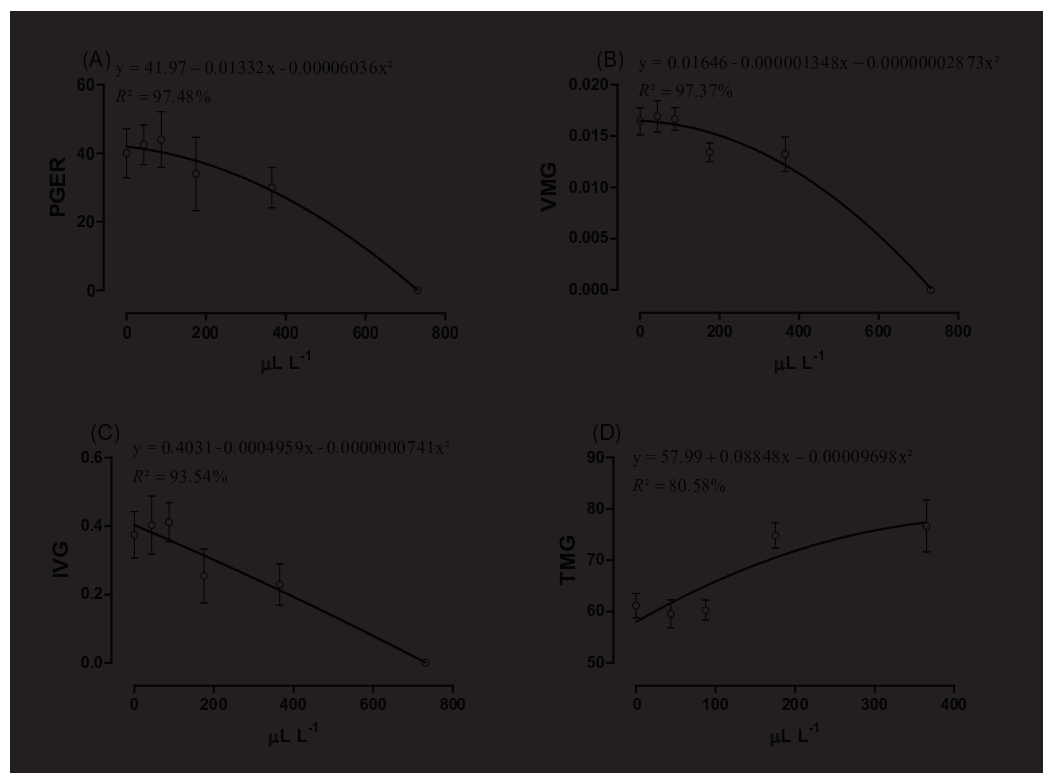


Figura 4 –Efeito do citronelol na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

Quando utilizada a mistura de citronelal (CA) e geraniol (GE), a PGER foi novamente inibida aos valores próximos de zero em doses próximas de 2400  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 5A), assemelhando-se aos resultados obtidos do óleo de *C. winterianus* (OEC) (2500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (Figura 1A).

Os valores de VMG foram novamente influenciados pelo aumento da dose da mistura citronelal e geraniol, desta vez, apresentando valores próximos de zero em doses de 2800  $\mu\text{L L}^{-1}$ , valor mais alto até então (Figura 5B).

O TMG aumentou com o aumento da dose da mistura (Figura 5D), e o IVG apresentou valores próximos de zero em doses aproximadas de 1.750  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 5C). Estes valores foram menores que os obtidos com óleo essencial de *C. winterianus* (OEC) (Figura 1C).

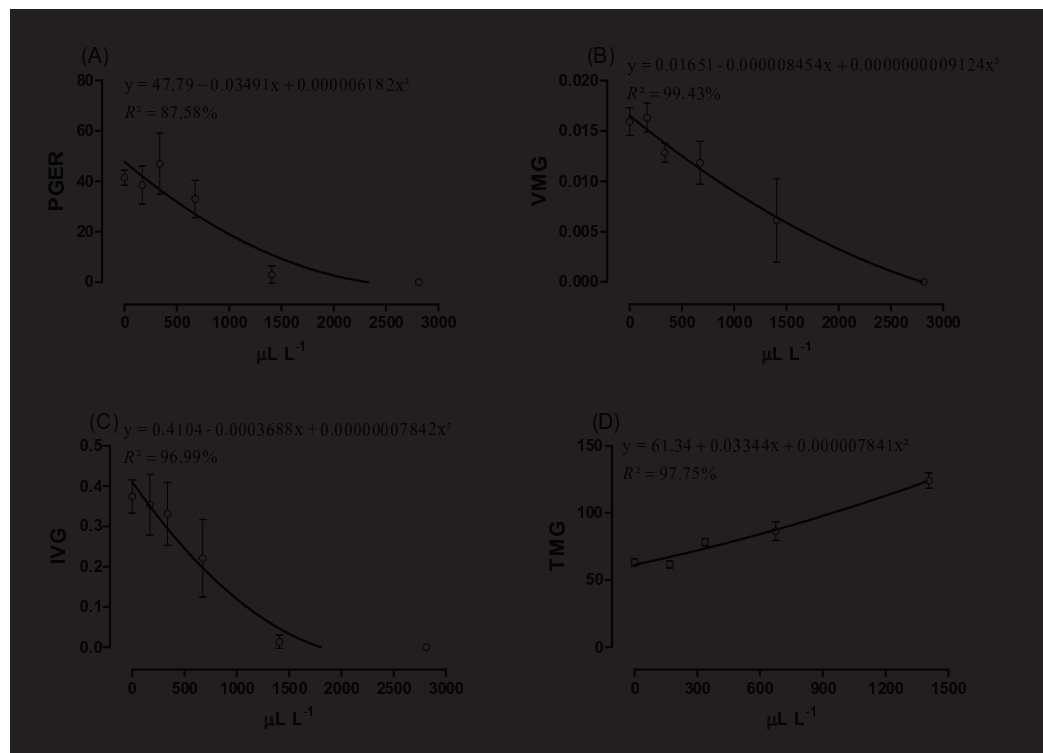


Figura 5 – Efeito do citronelal + geraniol na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

Os valores obtidos das variáveis de germinação referentes à mistura de citronelol e citronelal, mais uma vez, apresentaram forte efeito alelopático dos terpenoides sobre a germinação de *E. heterophylla* (Figura 6). A porcentagem de germinação (PGER) foi fortemente inibida pelo aumento da dose da mistura de citronelol e citronelal, inibindo completamente a germinação em doses de aproximadamente 1200  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 6A).

A VMG sofreu forte inibição pelo aumento da concentração da mistura de citronelol e citronelal (Figura 6B), assim como o TMG foi influenciado significativamente pelo aumento da dose da mistura de citronelol e citronelal (Figura 6D).

O índice de velocidade de germinação (IVG) atingiu valores próximos de zero em doses de aproximadamente 1600  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 6C), valor idêntico aos encontrados na mistura citronelal (CA) e geraniol (GE) e do citronelal isolado (Figuras 5C e 2C).

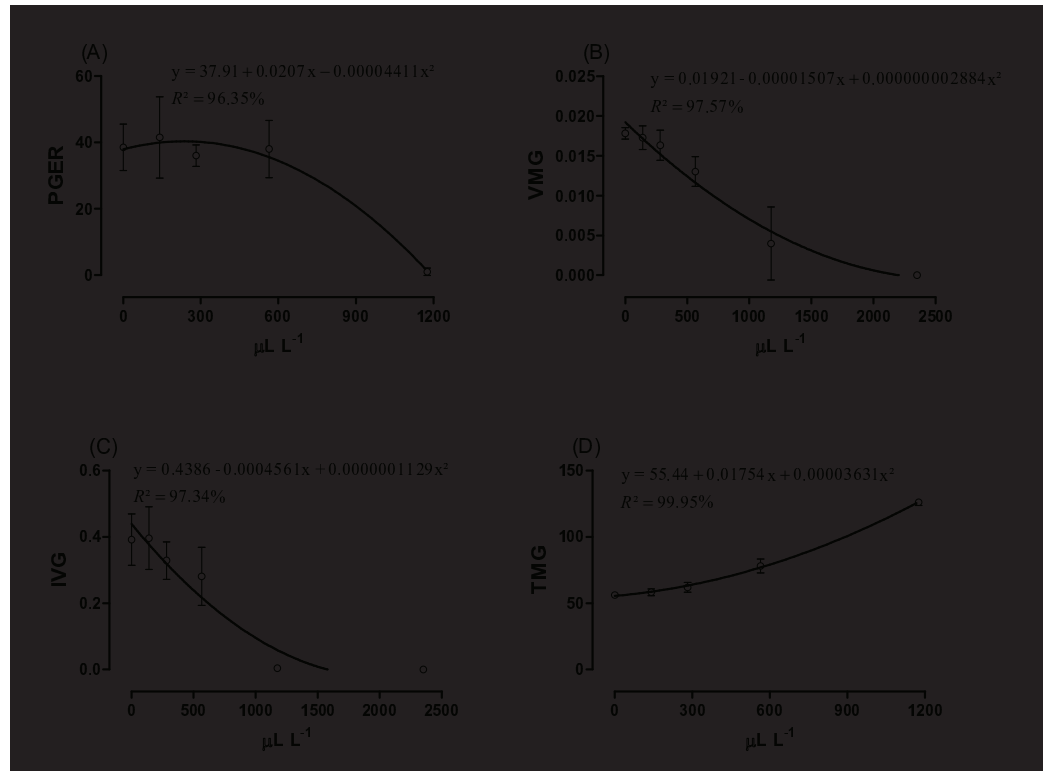


Figura 6 – Efeito do citronelol + citronelal na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

A mistura de citronelol e geraniol apresenta influência significativa nas variáveis de germinação avaliadas. A PGER foi fortemente inibida pelo aumento da mistura de citronelol e geraniol, causando inibição completa da germinação em doses aproximadas de 900  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 7A), sendo maior apenas que do citronelol puro (750  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (Figura 4A).

A velocidade média de germinação (VMG) foi inibida significativamente pelo aumento da dose da mistura de CO e GE (Figura 7B), alcançando valores próximos de zero em doses de aproximadamente 950  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O TMG novamente sofreu incremento

significativo, indicando que os terpenos influenciam em um/ou alguns processos germinativos, causando o retardo da germinação.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi drasticamente inibido pelo aumento da dose da mistura de citrionelol e geraniol, esta variável foi totalmente inibida em doses de aproximadamente 650  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 7C), sendo este o menor valor encontrado até o momento.

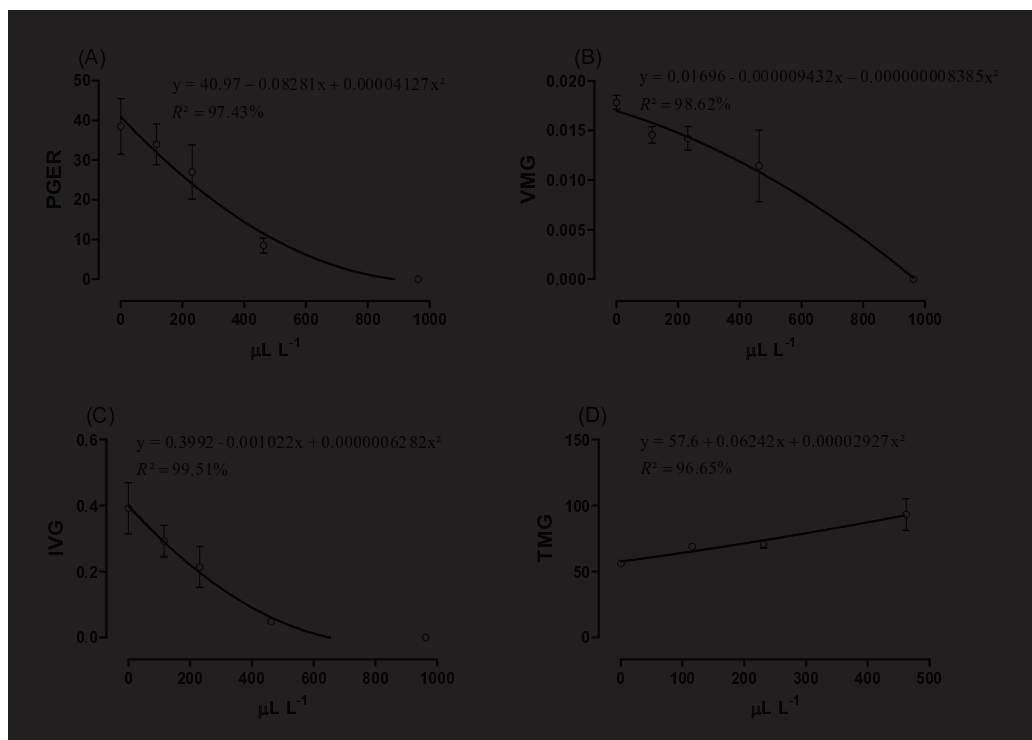


Figura 7 – Efeito do citrionelol + geraniol na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

Referente à mistura de citrionelol, geraniol e citrionelol, as variáveis germinativas foram influenciadas pelo aumento da dose. A PGER foi significativamente inibida, não se observando germinação em doses aproximadas de 1800  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 8A), indicando que a mistura nas mesmas proporções dos terpenoides majoritários do óleo essencial de *C. winterianus* possui maior capacidade de inibição da germinação de *E. heterophylla* que próprio óleo essencial de *C. winterianus*, que apresentou inibição total da germinação em doses aproximadas de 2500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 1A).

A velocidade média de germinação sofreu significativa inibição pelo aumento da dose da mistura de citronelal, geraniol e citronelol, apresentando valores próximos de zero em doses de aproximadamente 1800  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 8B), quando comparada à dose de 2500  $\mu\text{L L}^{-1}$  necessária para a inibição total da VMG pelo óleo essencial de *C. winterianus* (Figura 1B). Observamos aparente diferença entre os tratamentos.

O tempo médio de germinação (TMG) foi significativamente afetado, apresentando efeito inibitório com o aumento da dose da mistura citronelal, geraniol e citronelol (Figura 8D).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi novamente afetado significativamente pelo incremento da dose da mistura citronelal, geraniol e citronelol (Figura 8C), atingindo valores próximos de zero em doses de aproximadamente 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , aparentemente diferente da dose de 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 1C) encontrada no óleo essencial de *C. winterianus*.

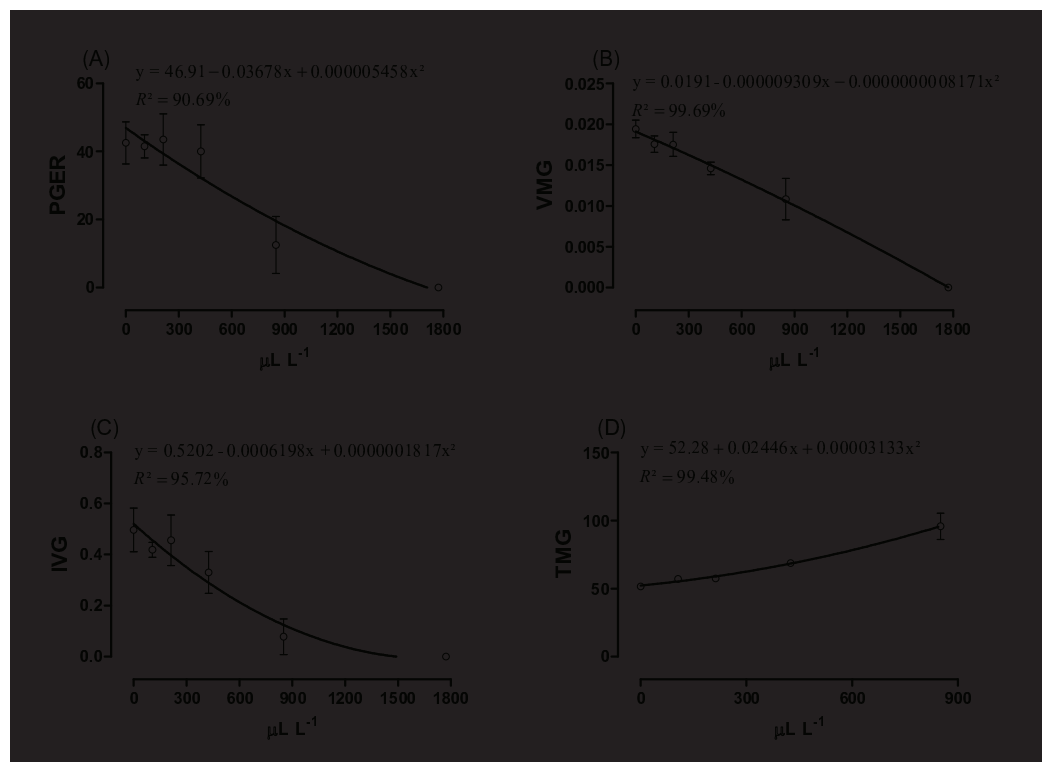


Figura 8 – Efeito do citronelal + geraniol + citronelol na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*.

O citronelal, geraniol e citronelol são responsáveis por 70,9% do óleo essencial de *C. winterianus* testado (Tabela 1). Pode-se pressupor que os demais constituintes (29,1%) apresentam efeito antagônico e/ou menor efeito inibitório das variáveis estudadas. Assim, os resultados obtidos pela mistura de citronelal, geraniol e citronelol aparentemente diferem dos resultados do óleo essencial (Figuras 1 e 8), cujos valores foram novamente analisados na forma de DL<sub>50</sub> como observado na Tabela 2.

A inibição do processo germinativo como um todo representa uma interferência em um ou alguns processos metabólicos relacionados com a germinação. A redução da germinação de *E. heterophylla* pelo aumento da dose de óleo essencial de *C. winterianus* já foi descrita anteriormente por Reis (2011), descrevendo ainda o significativo efeito inibitório do óleo essencial de *C. winterianus* na respiração mitocondrial. Esta redução da respiração pode explicar, em parte, a redução da velocidade de germinação (VMG) e o aumento do tempo médio de germinação (TMG), devido a redução da atividade da ATP sintase, provavelmente, por gerar danos à membrana mitocondrial (LORBER E MULLER, 1976). Danos à membrana podem desfazer o gradiente eletroquímico, causando colapso no funcionamento da ATP sintase e, conseqüentemente, na produção de ATP. Outros estudos indicam que os monoterpenos, além de causar danos à membrana mitocondrial (LORBER E MULLER, 1976), podem inibir a respiração mitocondrial e de ápices (REIS, 2011), a respiração celular (SINGH, H. P. ET AL., 2002; SINGH, HARMINDER P. ET AL., 2002; BATISH ET AL., 2004; SETIA ET AL., 2007) e a respiração de plantas inteiras (BATISH ET AL., 2007).

A redução da produção de ATP pela redução da respiração mitocondrial (REIS, 2011), conseqüentemente, compromete a produção e fornecimento de ATP necessária à divisão celular. Esse efeito pode ser a causa da redução do índice mitótico de *E. heterophylla* (GUSMAN ET AL., 1990). A redução do índice mitótico, por sua vez, pode aumentar o tempo médio de germinação (TMG) e reduzir a porcentagem de germinação (PGER), velocidade média de germinação (VMG) e índice de velocidade de germinação (IVG).

A inibição da germinação de *E. heterophylla* pode ser causada pela inibição da mitose causada pelo citronelol (GUSMAN ET AL., 1990), e/ou pelo extravasamento celular observado por Batish *et al.* (2007). Estes autores, ao testarem o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, cujo componente majoritário é o citronelal, verificaram aumento significativo do vazamento de eletrólitos, indicando ação principalmente sobre a membrana plasmática.

A aplicação de citronelol nas sementes causou aumento do TMG e redução da VMG. Em nível de campo, isto representa redução da capacidade competitiva das plantas, reduzindo

o vigor do crescimento inicial e, posteriormente, a redução da massa seca, da taxa de assimilação de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida e área foliar específica (GUSMAN *ET AL.*, 1994).

De maneira geral, a análise das variáveis de germinação (Figuras 1, a 8) indica que o óleo essencial de *C. winterianus*, assim como os terpenoides citronelal, geraniol, citronelol e suas misturas influenciam o processo germinativo em termos quantitativos e qualitativos. A interferência do óleo essencial pode estar ocorrendo diretamente em um ou alguns processos embrionários de forma letal, como o processo respiratório (LORBER E MULLER, 1976; REIS, 2011), impedindo a germinação e/ou retardando a degradação e/ou mobilização de reservas do endosperma para o embrião, tornando o processo germinativo mais lento ou inexistente.

#### 4.3. Comparação das DL<sub>50</sub> sobre variáveis de germinação.

A avaliação das DL<sub>50</sub> sobre a porcentagem de germinação (PGER) demonstra que o citronelol (CO), geraniol (GE) e a mistura dos dois compostos (CO+GE) apresentaram menor DL<sub>50</sub> sobre a PGER. Valores menores de DL<sub>50</sub> indicam maior efetividade de inibição da PGER por dose (Tabela 2), sugerindo que os terpenos CO e GE e sua mistura CO+GE apresentam maior efetividade de inibição da germinação.

As misturas citronelal e citronelol (CA+CO) e CA+CO+GE diferiram significativamente dos demais tratamentos, apresentando valor intermediário de DL<sub>50</sub> sobre a PGER (Tabela 2). Esse resultado sugere que a menor efetividade do CA aumentou a DL<sub>50</sub> do CO na mistura (CA+CO) e do CO+GE em mistura com CA.

Os tratamentos CA, óleo essencial de *C. winterianus* (OEC) e GE+CA apresentaram os maiores valores de DL<sub>50</sub>, sugerindo ainda efeito antagônico entre o GE e CA, sendo a DL<sub>50</sub> do GE puro 55,96  $\mu\text{L L}^{-1}$ , a DL<sub>50</sub> da CA puro 114,71  $\mu\text{L L}^{-1}$  e da mistura GE+CA 123,33  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Tabela 2).

Destaca-se que a mistura CA+CO+GE representa 70,9% do OEC (Tabela 1), entretanto os tratamentos OEC e CA+CO+GE apresentaram diferença significativa entre eles, sugerindo que os demais compostos presentes no OEC apresentam menor efeito inibitório e/ou efeito antagônico aos compostos majoritários (Tabela 2).

Tabela 2: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas sobre a porcentagem de germinação (PGER) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)

Tratamento	Média (DL <sub>50</sub> ) PGER (µL L <sup>-1</sup> )	Scott-Knott a 0,05
GE + CA	123,33	A
OEC	120,67	A
CA	114,71	A
CA + CO	101,57	B
CA + CO + GE	84,45	B
GE	55,96	C
GE + CO	43,65	C
CO	39,50	C

A análise das DL<sub>50</sub> sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) apresentou diferença significativa entre os tratamentos. O CO e a mistura GE+CO apresentaram menor valor de DL<sub>50</sub> sobre o IVG, demonstrando a maior efetividade e/ou efeito alelopático destes tratamentos sobre o IVG (Tabela 3).

O GE isolado apresentou segundo menor valor estatístico de DL<sub>50</sub>, diferindo significativamente da mistura CA+CO+GE, que apresentou o terceiro valor estatístico, sugerindo que a adição do CA elevou a DL<sub>50</sub> do CO e GE (Tabela 3).

O CA e a mistura CA+CO apresentaram diferença significativa dos demais tratamentos, sugerindo que a CA apresentou efeito antagônico ao CO (DL<sub>50</sub> 37,43 µL L<sup>-1</sup>) pela elevação drástica da DL<sub>50</sub> causada pela mistura CA+CO (DL<sub>50</sub> 98,16 µL L<sup>-1</sup>) (Tabela 3).

O OEC e a mistura GE+CA apresentaram os maiores valores de DL<sub>50</sub> para o IVG, sugerindo efeito antagônico entre o GE e CA pela elevação da DL<sub>50</sub>. O OEC diferiu significativamente da mistura CA+GE+CO, sugerindo que os demais componentes responsáveis por 29,1% do OEC (Tabela 1) apresentam maiores DL<sub>50</sub> para o IVG e/ou efeito antagônico ao CA, GE e CO (Tabela 3).



Tabela 3: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)

Tratamento	Média (DL <sub>50</sub> ) IVG (μL L <sup>-1</sup> )	Scott-Knott a 0,05
GE + CA	118,65	A
OEC	117,07	A
CA + CO	98,16	B
CA	94,80	B
CA + CO + GE	79,14	C
GE	54,16	D
GE + CO	41,57	E
CO	37,43	E

A velocidade média de germinação (VMG) representa a velocidade média expressa em horas necessárias para a germinação das sementes. A DL<sub>50</sub> do VMG expressa a dose média necessária para inibição da VMG em 50%, representado a cinética do processo germinativo.

Os tratamentos CO, GE e GE+CO apresentaram os menores valores de DL<sub>50</sub> para inibição da VMG, demonstrando que estes tratamentos possuem maior efeito inibitório sobre a variável (Tabela 4), assemelhando-se aos resultados obtidos na Tabela 2 (DL<sub>50</sub> da PGER).

As misturas CA+CO+GE e CA+CO apresentaram valores intermediários de DL<sub>50</sub>. Neste caso, não fica evidente efeito antagônico entre o CA e GE e CO pelo fato da DL<sub>50</sub> da CA isolado apresentar o maior valor de DL<sub>50</sub> encontrado (Tabela 4). O incremento da DL<sub>50</sub>, neste caso, pode ser reflexo apenas da mistura do CA que apresenta DL<sub>50</sub> de 137,39 μL L<sup>-1</sup>, que se comparada ao GE (65,03 μL L<sup>-1</sup>), CO (40,13 μL L<sup>-1</sup>) e mistura GE+CO (50,52 μL L<sup>-1</sup>) aproximasse do valor da mistura CA+CO+GE (DL<sub>50</sub> 90,01 μL L<sup>-1</sup>) pela média numérica.

A DL<sub>50</sub> da OEC diferiu significativamente dos valores apresentados pela mistura CA+CO+GE, indicando efeito antagônico com os demais componentes do OEC e/ou menor efeito inibitório da VMG (Tabela 4).

Tabela 4: Dose letal média (DL<sub>50</sub>) de citronelol (CO), citronelal (CA), geraniol (GE), óleo essencial de citronela (OEC) e suas misturas a velocidade média de germinação (VMG) de *E. heterophylla* avaliada pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)

Tratamento	Média (DL <sub>50</sub> ) VMG (µL L <sup>-1</sup> )	Scott-Knott (p<0,05)
CA	137,39	A
GE + CA	135,14	A
OEC	127,69	A
CA + CO	106,77	B
CA + CO + GE	90,01	B
GE	65,03	C
GE + CO	50,52	C
CO	40,13	C

Os efeitos antagônicos e sinérgicos nas interações dos componentes de óleos essenciais não são novidade. He *et al.* (2009) estudando 36 misturas de cinco terpenoides sobre a inibição do comprimento radicular de *Echinochloa crus-gali*, observaram diferenças significativas entre misturas diferentes, que seria uma possível interação com efeito antagônico/sinérgico entre os constituintes. Franzios *et al.* (1997) em estudos sobre o efeito inseticida de misturas de terpenoides e óleos essenciais, observaram efeito sinérgico entre os constituintes.

São escassos os trabalhos que apresentam evidências dos efeitos sinérgicos e/ou antagônicos entre os constituintes de óleos essenciais, necessitando mais estudos e abrindo novos caminhos para a pesquisa deste fenômeno.

#### 4.4. Efeito dos monoterpenos no crescimento de *E. heterophylla*.

As variáveis biométricas de crescimento de *E. heterophylla* foram afetadas pelo aumento da dose dos terpenoides citronelal (CA), geraniol (GE) e citronelol (CO). O comprimento da parte aérea (CPA) foi inibido significativamente pelo aumento da dose de CA, atingindo valores próximos de zero em doses de 0,07% (v/v) (Figura 9A).

O comprimento do sistema radicular (CSR) foi totalmente inibido pelo aumento da concentração de CA em doses de aproximadamente 0,055% (v/v) (Figura 9B). Neste caso, a inibição do CSR foi mais intensa em comparação ao do CPA (dose 0,07%) (Figura 9A).

O comprimento total (CT), produto da soma algébrica do CPA e CSR, foi totalmente inibido em doses de aproximadamente 0,065% (v/v) de CA, caracterizando inibição total do crescimento da plântula de *E. heterophylla* (Figura 9C).

A relação comprimento da parte aérea/sistema radicular apresentou resposta diretamente proporcional ao aumento da dose de CA, indicando maior inibição do CSR em comparação ao CPA (Figura 9D), e maior susceptibilidade do sistema radicular em comparação a parte aérea, possivelmente pelo contato direto com a solução contendo o terpenoide.

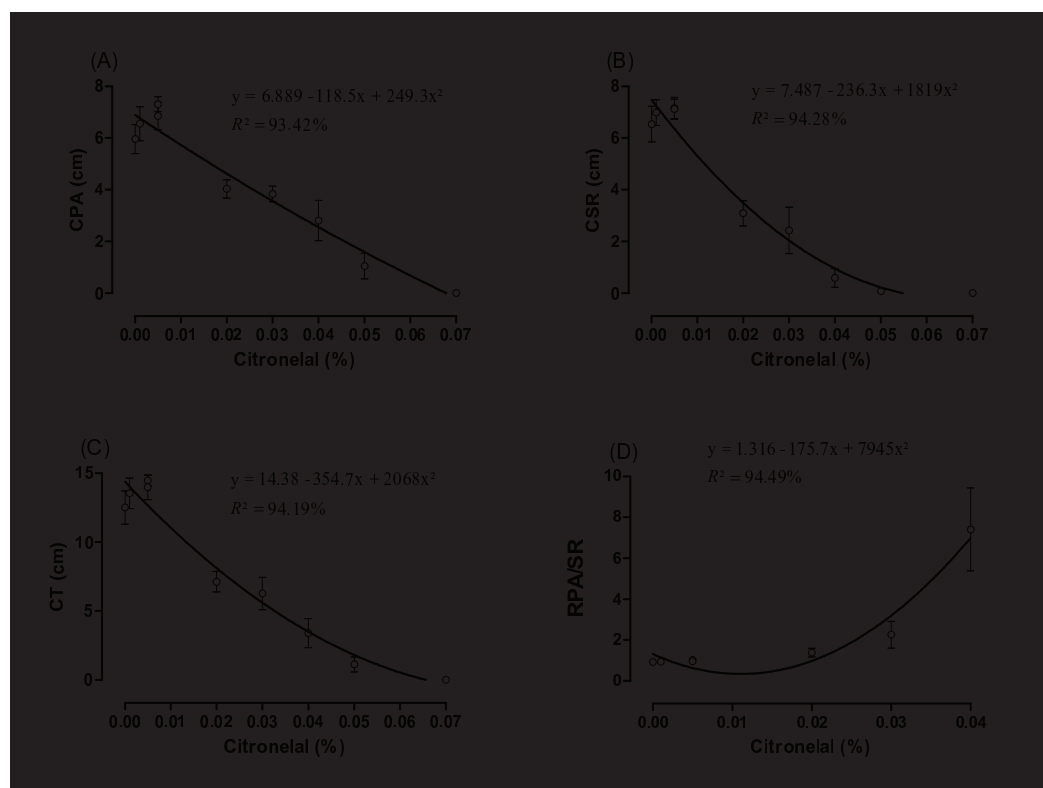


Figura 9 – Efeito do citronelal no comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT) e relação comprimento da parte aérea sistema radicular (RPA/SR) de *E. heterophylla*.

A variação de biomassa foi afetada pelo aumento da porcentagem de citronelal (CA). O CA inibiu significativamente o acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) (Figura 10A), tal resultado pode ser reflexo da inibição do CPA, representando o menor acúmulo de biomassa e, provavelmente, menor assimilação de carbono.

A massa seca do sistema radicular (MSSR) foi severamente inibida com aumento da dose de CA, refletindo possível inibição da fixação de carbono pela plântula (Figura 10B). A massa seca total (MST) segue a inibição das demais massas secas, apresentando efeito inibitório com aumento da concentração de CA (Figura 10C).

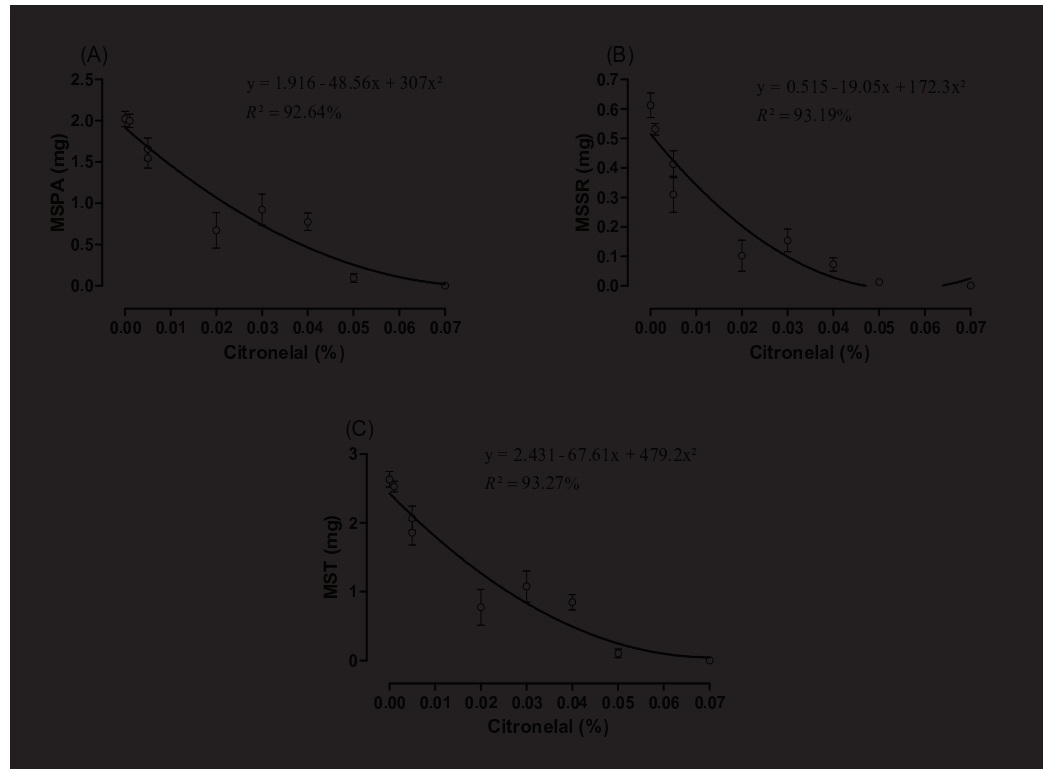


Figura 10 – Efeito do citronelal na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MS) de *E. heterophylla*.

O geraniol (GE) apresentou forte efeito inibitório sobre as variáveis biométricas de *E. heterophylla*. O comprimento da parte aérea (CPA) apresentou resposta inversamente proporcional à dose de GE, apresentando valores próximos de zero em doses aproximadas de 0,019% (v/v) (Figura 11A).

Novamente, o comprimento do sistema radicular (CSR) e o comprimento total foram totalmente inibidos pelo aumento da concentração de GE (Figuras 11B e 11C). A relação comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) apresentou comportamento semelhante à RPA/SR do citronelal (Figura 9D), indicando que o CSR foi mais afetado que o CPA com o aumento da dose de GE (Figura 11D).

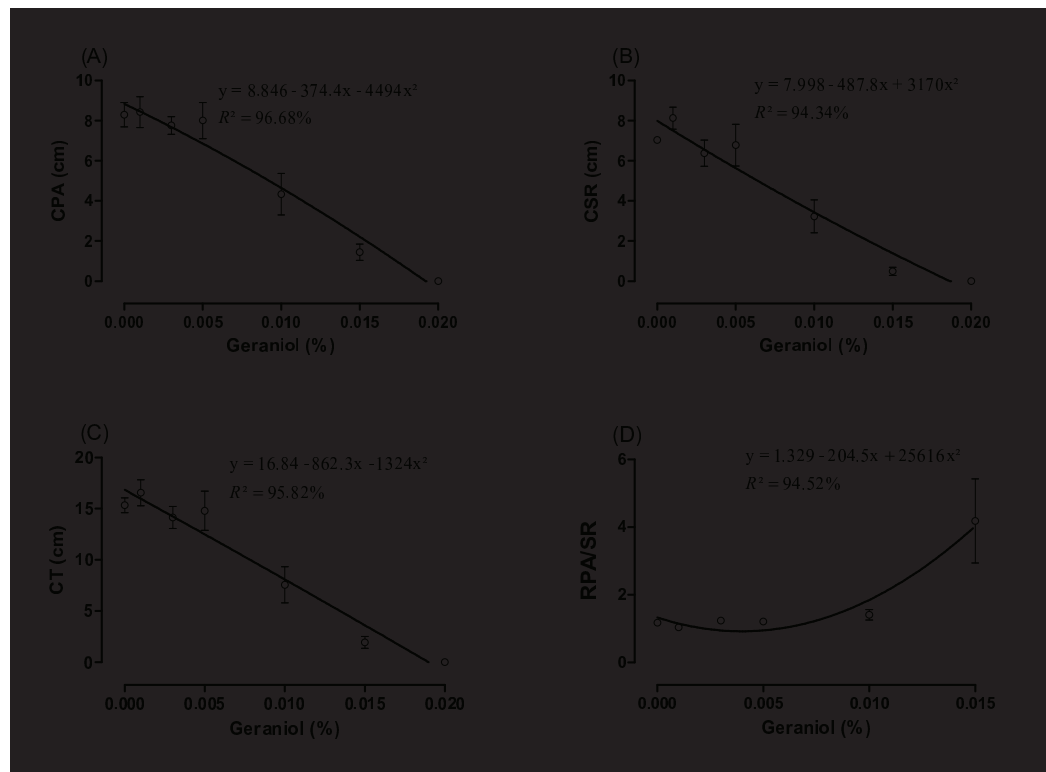


Figura 11 – Efeito do geraniol no comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT) e relação comprimento da parte aérea sistema radicular (RPA/SR) de *E. heterophylla*.

A massa seca da parte aérea (MSPA) foi inibida pelo aumento da dose de GE, apresentando valores próximos de zero em doses aproximadas de 0,019% (v/v) (Figura 12A).

A massa seca do sistema radicular (MSSR) foi inibida pelo aumento da concentração de GE e, conseqüentemente, a massa seca total apresentou a mesma tendência da MSPA e MSSR, apresentando valores próximos de zero em doses de 0,019% (v/v) (Figura 12D).

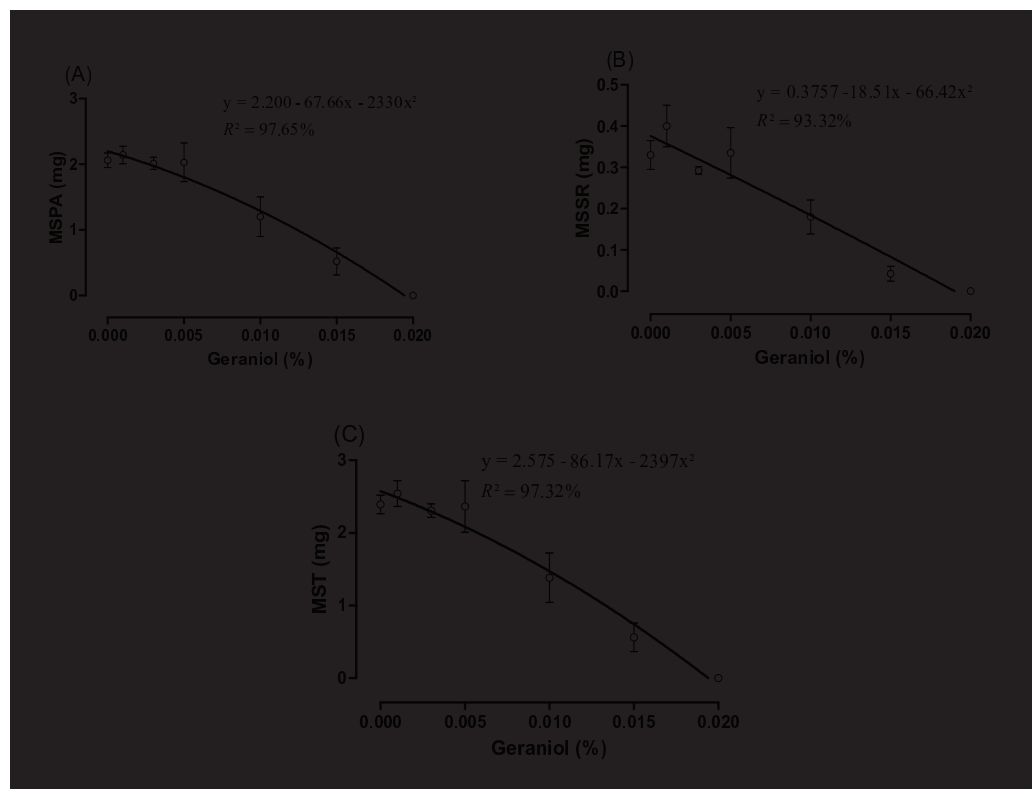


Figura 12 – Efeito do geraniol na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MS) de *E. heterophylla*.

O citronelol (CO) apresentou forte efeito inibitório e/ou alelopático nas variáveis biométricas de *E. heterophylla* (Figura 13). O comprimento da parte aérea (CPA) atingiu valores muito próximos de zero em doses de aproximadamente 0,02% (v/v) (Figura 13A), valor próximo do encontrado em GE (0,019%) (Figura 11A) e menor que o de CA (0,07%) (Figura 9A). Os dados sugerem que o CA é menos efetivo na inibição do CPA que o CO e GE.

O comprimento do sistema radicular (CSR) foi inibido pelo CO, atingindo valores próximos de zero em doses aproximadas de 0,019% (v/v) (Figura 13B), valor semelhante ao encontrado com GE (0,019%) (Figura 11B) e menor que o obtido com CA (0,055%) (Figura 9B), novamente sugerindo que o CA possui menor capacidade de inibir o CSR na mesma dose que CO e GE.

O comprimento total foi significativamente inibido pelo aumento da dose de CO (Figura 13C), que em doses de 0,02% (v/v) inibiu totalmente o crescimento de *E. heterophylla*, doses similares ao encontrada com GE (0,019%) (Figura 11C) e menor que a

obtida com CA (0,065%) (Figura 9C). Tais resultados seguem a tendência observada durante a análise das DL<sub>50</sub> sobre as variáveis de germinação (Tabelas 2, 3 e 4), em que o GE e o CO demonstraram-se mais eficientes na inibição das variáveis que o CA.

De qualquer forma, as doses obtidas para inibição total do crescimento da planta por CA foram bastante reduzida (0,065% (v/v)), viabilizando sua utilização como bioherbicida.

A relação comprimento parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) apresentou resposta semelhante aos demais terpenoides testados, indicando que o CSR é mais susceptível aos terpenoide que o CPA. Vale destacar novamente que tais resultados podem ser devido ao constante contato do sistema radicular com a solução contendo os terpenoides (Figura 13D).

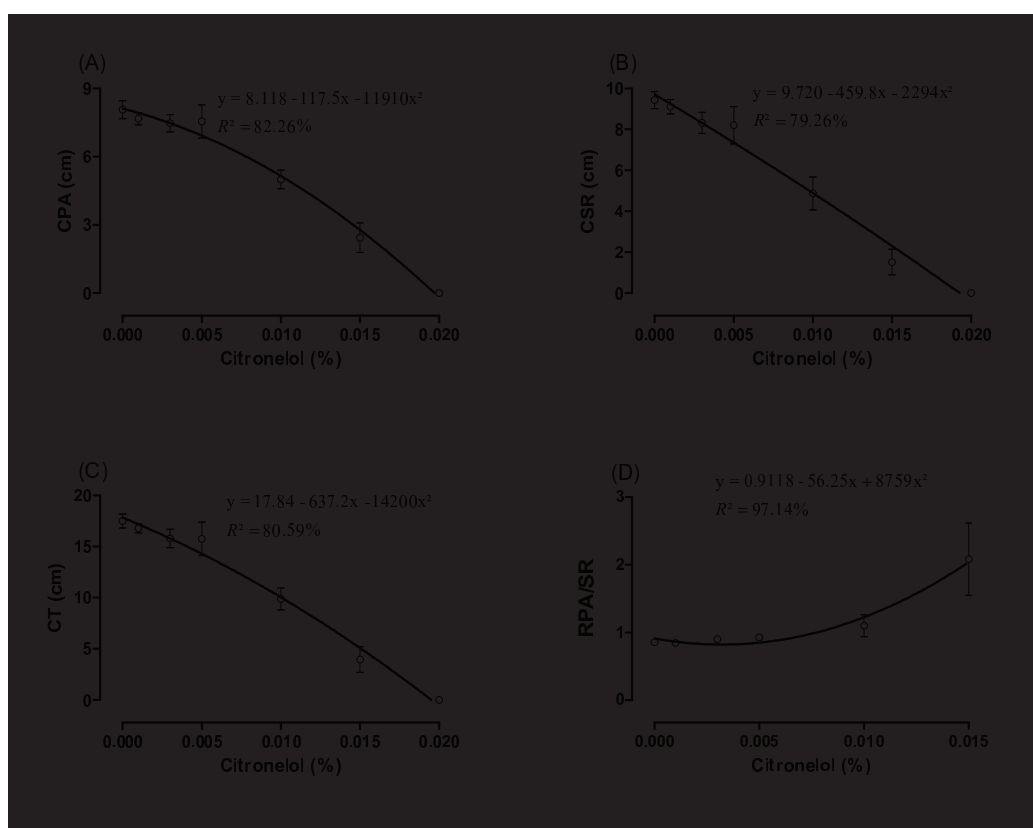


Figura 13 – Efeito do citronelol no comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT) e relação comprimento da parte aérea sistema radicular (RPA/SR) de *E. heterophylla*.

A massa seca da parte aérea (MSPA), assemelhando-se aos resultados obtidos com CA e GE, apresentou redução significativa com aumento da dose de CO (Figura 14A).

A massa seca do sistema radicular (MSSR) foi fortemente inibida com o aumento da dose de CO (Figura 14B). A massa seca total (MST) segue a tendência da MSPA e MSSR, apresentando inibição com aumento da dose de CO, adotando valores próximos de zero quando submetidos às pequenas doses de CO (0,02% (v/v)) (Figura 14C), semelhante aos valores encontrados com GE (0,019%) (Figura 12C) e inferior ao encontrado com CA (0,07%) (Figura 10C).

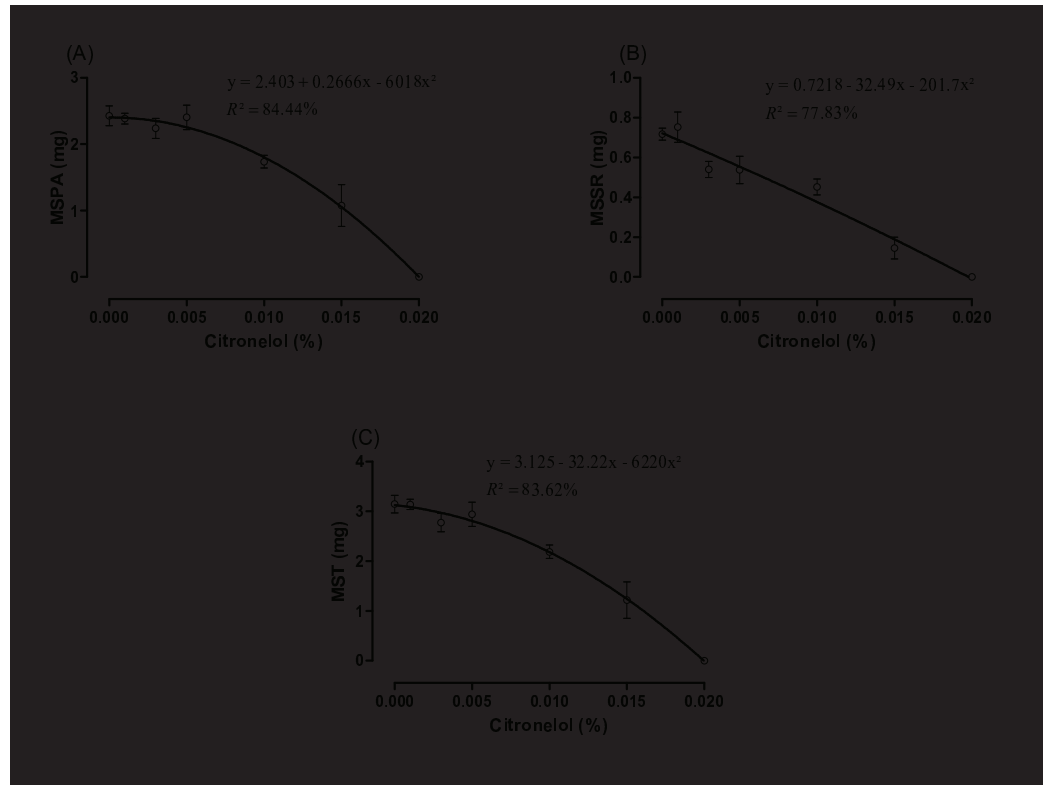


Figura 14 – Efeito do citronelol na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MS) de *E. heterophylla*.

O crescimento de uma planta é o resultado da divisão celular e do alongamento celular (FERREIRA E BORGHETTI, 2004; TAIZ E ZEIGER, 2012). Assim, qualquer interferência em um ou em ambos os processos compromete o crescimento das plantas. Neste caso, o óleo essencial pode ter afetado a divisão celular e/ou o alongamento celular direta ou indiretamente, como observado por Gusman *et al* (1994) que, ao utilizar o citronelol, observaram inibição das variáveis biométricas (diâmetro do xilema do caule e câmbio vascular) e no teor de amido. Estes mesmos autores (GUSMAN et al., 1990) verificaram também o efeito inibitório do citronelol volatilizado na mitose (30,5%) de *E. heterophylla*.



O citronelol causou redução do comprimento, no número de folhas, área foliar e massa seca de plantas de *E. heterophylla* (GUSMAN *ET AL.*, 1994). Outros estudos demonstram efeito inibitório do óleo essencial de citronela, cujos componentes majoritários são o citronelal, geraniol e citronelol, sobre as variáveis de crescimento, germinação e respiração de ápices e mitocondrial de *E. heretophylla* (REIS, 2011). Tais resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, deixando clara a necessidade de mais estudos para identificar outras causas da redução das variáveis biométricas, como a taxa fotossintética, diretamente responsável pelo acúmulo de biomassa.

#### 4.5. Efeito dos monoterpenos no controle pós-emergência inicial de *E. heterophylla* em vaso

Uma vez identificado o potente efeito inibitório do citronelal (CA), geraniol (GE) e citronelol (CO) sobre *E. heterophylla in vitro*, testaram-se os terpenoides em casa de vegetação.

A porcentagem de plantas vivas corresponde à porcentagem de plantas que apresentou ao menos uma parte verde (viva) 8 dias após a aplicação dos terpenos. A aplicação de CA reduziu a porcentagem de plantas vivas. Doses iguais ou superiores a 4% mantiveram cerca de 30% de plantas vivas 8 dias após a aplicação (Figura 15A).

A porcentagem de controle representa a porcentagem de plantas mortas, que não apresentou nenhuma parte verde 8 dias após a aplicação. A aplicação de CA nas doses testadas chegou a controlar cerca de 70% das plantas, apresentando diferença significativa (Figura 15B), de acordo com a linha de tendência obtida pela regressão polinomial de segundo grau dos valores mensurados. Doses superiores à dose máxima (6%), supostamente, não incrementaram a porcentagem de controle. Mais estudos são necessários, mas possivelmente a utilização do CA como bioherbicida para controle de *E. heretophylla* em pós emergência inicial (2 a 4 folhas) (LORENZI, HARRI, 2006) seja inviável.

A porcentagem de plantas viáveis corresponde ao número de plantas que emitiram folhas novas em até 8 dias após a aplicação dos terpenoides. Mesmo com o incremento da dose de CA e a diferença significativa, observa-se que cerca de 25% das plantas emitiram folhas novas (Figura 15C). Plantas estas que podem se desenvolver e completar o ciclo de vida, produzindo sementes e interferindo na produtividade.

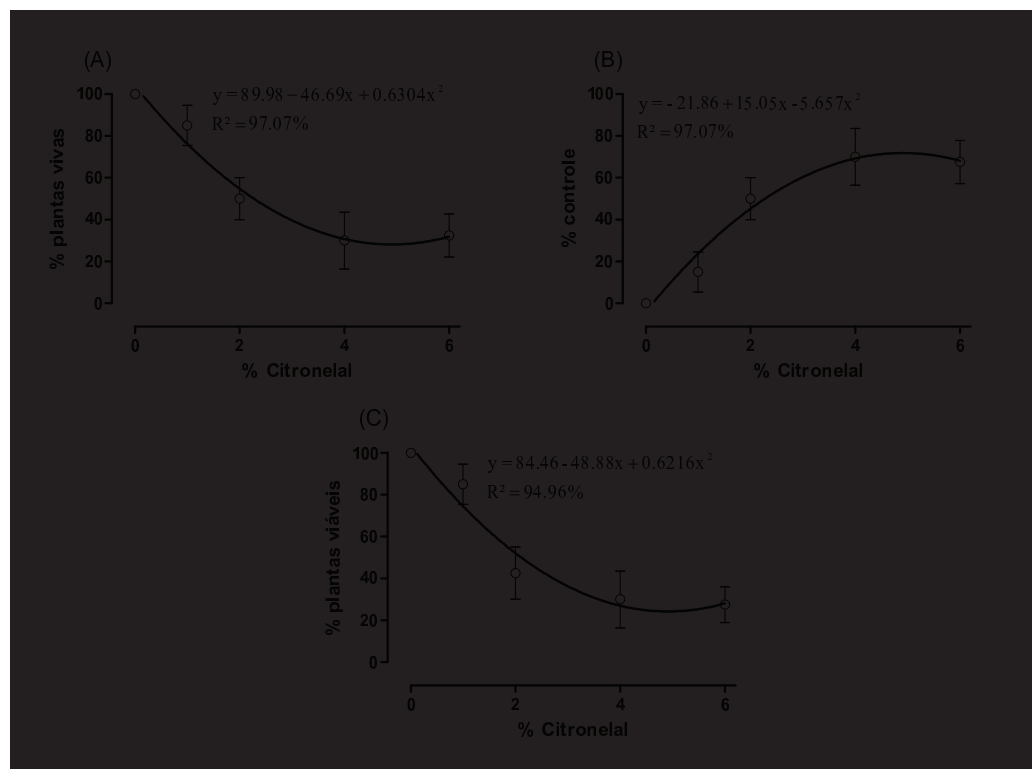


Figura 15 – Efeito do citronelal na porcentagem de plantas vivas, porcentagem de controle e porcentagem de plantas viáveis de *E. heterophylla*.

A porcentagem de plantas vivas 8 dias após a aplicação de geraniol (GE) foi drasticamente reduzida com o incremento da dose (Figura 16A). Conseqüentemente, a porcentagem de controle foi elevada, atingindo valores em torno de 90% (Figura 16B).

A porcentagem de plantas que emitiram folhas novas 8 dias após a aplicação de GE foi reduzida com o aumento da dose aplicada (Figura 16C), observou-se valores próximos de zero na linha de tendência em doses próximas de 4% (v/v). Tais valores refletem maior eficiência no controle de plantas de *E. heterophylla* em pós emergência inicial, sugerindo que o GE possa ser utilizado em futuros experimentos em nível de campo para o controle de plantas daninhas por apresentar alta eficiência de controle.

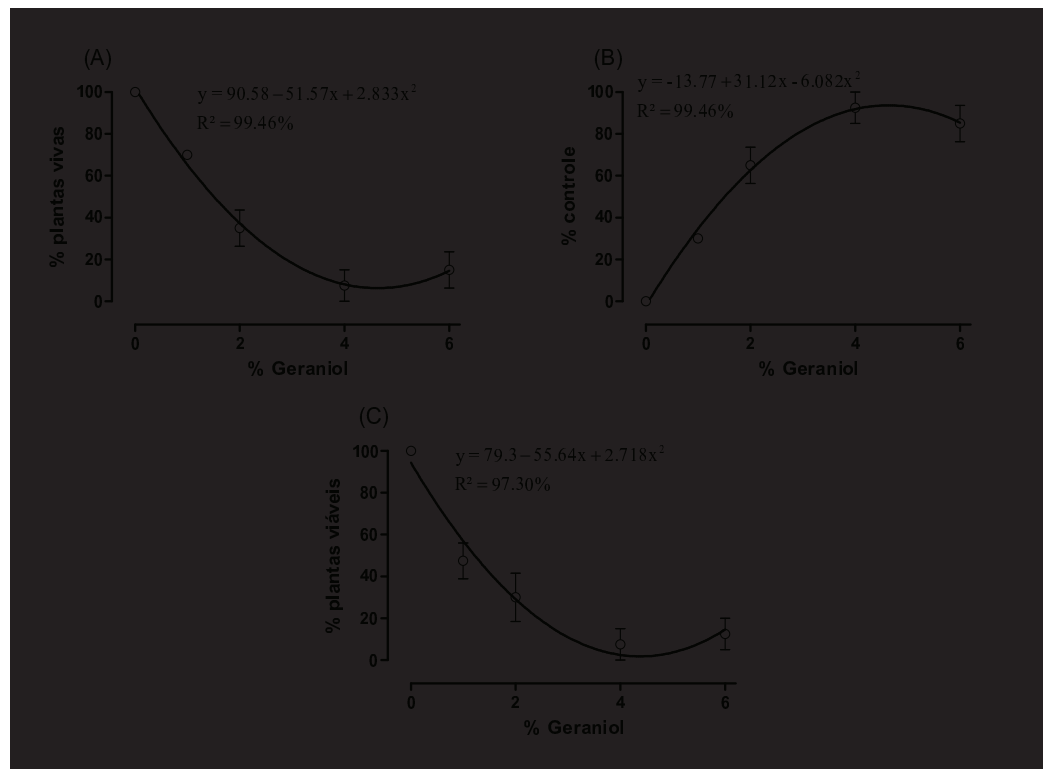


Figura 16 – Efeito do geraniol na porcentagem de plantas vivas, porcentagem de controle e porcentagem de plantas viáveis de *E. heterophylla*.

O citronelol (CO), assim como o geraniol, apresentou significativa redução da porcentagem de plantas vivas com o aumento da dose, chegando a valores muito próximos de zero (Figura 17A).

A porcentagem de controle foi significativamente elevada com o incremento da dose de CO, chegando a valores próximos de 90% de plantas mortas 8 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 17B).

A porcentagem de plantas viáveis que aparentemente pode completar seu ciclo de vida foi reduzida com o incremento da dose de CO (Figura 17C), atingindo valores próximos de 5%, que indica que, assim como o geraniol, o citronelol é eficaz no controle de *E. heterophylla* em pós emergência inicial. Entretanto, mais estudos em campo são necessários para o entendimento do processo, assim como a determinação da dose ideal para outras espécies de plantas daninhas importantes.

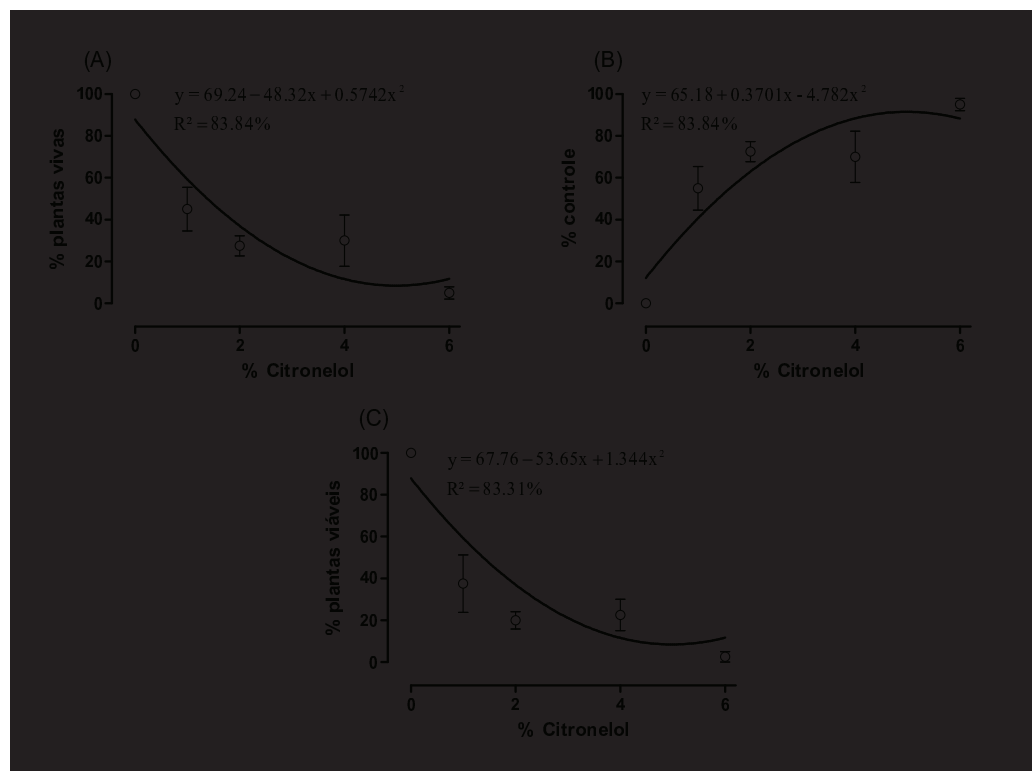


Figura 17 – Efeito do citronelol na porcentagem de plantas vivas, porcentagem de controle e porcentagem de plantas viáveis de *E. heterophylla*.

O controle em pós emergência inicial era esperado após os resultados analisados do crescimento inicial de *E. heterophylla* (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14), entretanto a dose necessária para o controle em pós emergência inicial (4-6% (v/v)) supera em muito a dose observada capaz de inibir totalmente o crescimento *in vitro* (CA 0,065, GE 0,019 e CO 0,02% (v/v)) (Figuras 9, 11 e 13). Tal resultado sugere que a permanência do contato com os terpenoides logo após o processo germinativo na placa de Petri potencializou o seu efeito. A volatilização dos terpenoides logo após a aplicação por pulverização no presente experimento pode ser a causa da necessidade de doses extremamente altas para o controle em pós emergência. Outros experimentos, aliando horário de aplicação, condições climáticas e a adição de produtos que facilitem a absorção e/ou inibam a volatilização dos terpenoides, são necessários para a recomendação prática destes compostos (SPECOS ET AL., 2010).

No presente experimento, observou-se necrose foliar causada pela pulverização dos terpenos. Resultados similares de aumento da necrose foliar com o incremento da dose de

óleo essencial de eucalipto, assim como o aumento do extravasamento celular, foram relatados por Singh *et al.* (2005).

## 5. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *C. winterianus*, assim como o citronelal (CA), geraniol (GE) e citronelol (CO) e suas respectivas misturas interferiram significativamente em todas as variáveis germinativas analisadas.

O CA apresenta efeito antagônico ao CO e GE, assim como os demais constituintes do óleo essencial de *C. winterianus* elevaram  $DL_{50}$  quando comparados aos seus componentes majoritários para a inibição da porcentagem de germinação (PGER), índice de velocidade de germinação (IVG) e velocidade média de germinação (VMG).

O CO e o GE demonstraram ser mais eficientes que o CA para a inibição das variáveis germinativas de *E. heterophylla*.

O CA, GE e CO inibiram completamente o comprimento do sistema radicular (CSSR), comprimento da parte aérea (CPA), e comprimento total (CT) durante crescimento inicial de *E. heretophylla in vitro* em doses menores que 0,07%. O CA foi menos efetivo que o GE e CO isoladamente.

A relação comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) sofreu aumento significativo com o aumento das doses de CA, GE e CO, indicando que o sistema radicular foi mais inibido que a parte aérea.

O CA, GE e CO apresentaram inibição significativa dos valores de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MST) de *E. heterophylla*.

O GE e CO são mais eficientes que o CA para o controle em pós emergência de plantas de *E. heterophylla*.

## REFERÊNCIAS

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

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois, USA: Allured publishing corporation, 1995.

- AKHILA, A. Biosynthesis of monoterpenes in *Cymbopogon winterianus*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 421-424, 1986.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PIZZO, I. V.; SCHIAVETTO, A. R. Weed Response on Fusel Oil Applied at Initial and Late Post-Emergence. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 541-549, Jul-Sep 2010.
- BAIRD, J.; DAVIES, B.; HINDS, P. S.; BAGGOTT, C.; REHM, R. S. What Impact Do Hospital and Unit-Based Rules Have Upon Patient and Family-Centered Care in the Pediatric Intensive Care Unit **Journal of pediatric nursing**, 2014.
- BALDWIN, I. T.; PRESTON, C. A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, n. 2, p. 137-145, 1999.
- BATISH, D. R.; SETIA, N.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v. 23, n. 12, p. 1209-1214, 2004.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R. K. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 61, n. 7-8, p. 465-471, 2006.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KOHLI, R. K.; KAUR, S.; YADAV, S. S. Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. **Agronomy for sustainable development**, v. 27, n. 3, p. 171-177, 2007.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the Growth and Macronutrient Accumulation of Soybean. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2010.
- DÍAZ-TIELAS, C.; GRANA, E.; SOTELO, T.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in Arabidopsis thaliana roots. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 8, p. 1500-1517, 2012.
- DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079-1089, 1999.
- EMBRAPA. **Sistemas de Produção -Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. 2012.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, 2004.

- FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2690-2694, 1997.
- GELMINI, G. A.; FILHO, R. V.; NOVO, M. D. D. S.; ADORYAN, M. L. Resistence of *Euphorbia heterophylla* L. to ALS-inhibiting herbicides in soybean. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 452-457, Sep-Oct 2005.
- GELMINI, G. A.; VICTÓRIA FILHO, R.; SOARES NOVO, M.; ADORYAN, M. L. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, v. 60, n. 2, p. 93-99, 2001.
- GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L.; PIMENTEL, N. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 01, p. 23-28, 2009.
- GRANA, E.; DÃAAZ-TIELAS, C.; M SANCHEZ-MOREIRAS, A.; J REIGOSA, M. Mode of Action of Monoterpenes in Plant-Plant Interactions. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, p. 80-89, 2012.
- GUSMAN, A. B.; MUCILLO, G.; PIRES, M. H. Efeito do citrionelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 20-24, 1990.
- GUSMAN, A. B.; PITELLI, R. A.; DIAS, S. M. Efeito do citrionelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia Heterophylla* L) II. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 14-22, 1994.
- HE, H.; WANG, H.; FANG, C.; LIN, Y.; ZENG, C.; WU, L.; GUO, W.; LIN, W. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on *Echinochloa crus-galli*. **Weed research**, v. 49, n. 2, p. 183-192, 2009.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 45, n. 3, p. 115-120, 1970.
- HUANG, C.-N.; CORNEJO, M.; BUSH, D.; JONES, R. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, n. 2-3, p. 80-87, 1986.
- HUANG, J.; CARDOZA, Y. J.; SCHMELZ, E. A.; RAINA, R.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 767-775, 2003.
- INOUE, Y.; SHIRAIISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 325-331, 2004.
- JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verlag Hamburg, 1998.

- KAUR, S.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. *Artemisia scoparia* essential oil inhibited root growth involves reactive oxygen species (ROS)-mediated disruption of oxidative metabolism: In vivo ROS detection and alterations in antioxidant enzymes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 390-399, 2012.
- KERN, K. A.; PERGO, E. M.; KAGAMI, F. L.; ARRAES, L. S.; SERT, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11–12, p. 1095-1101, 2009.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Eucalypt oils for the control of Parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.). **Crop Protection**, v. 17, n. 2, p. 119-122, 3// 1998.
- LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.
- LERDAU, M.; GRAY, D. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. **New Phytologist**, v. 157, n. 2, p. 199-211, 2003.
- LORBER, P.; MULLER, W. H. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany**, p. 196-200, 1976.
- LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. **Nova Odessa: Editora Plantarum Ltda 299p.-col. illus.. Por Icones. Geog**, v. 6, p. 339, 2006.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6. Nova Odessa: Editora Plantarum Ltda, 2006.
- LUIZA ISHII-IWAMOTO, E.; MARUSA PERGO COELHO, E.; REIS, B.; SEBASTIAO MOSCHETA, I.; MOACIR BONATO, C. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, p. 50-64, 2012.
- MARTINS, R. Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. **Rev Bras Pl Med Botucatu**, v. 8, n. 2, p. 71-78, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Regra para análise de sementes**. 2009.
- MOORE, A.; DONAHUE, C. J.; BAUER, K. D.; MATHER, J. P. Chapter 15 Simultaneous Measurement of Cell Cycle and Apoptotic Cell Death. In: JENNIE, P. M. e DAVID, B. (Ed.). **Methods in Cell Biology**: Academic Press, v. Volume 57, 1998.
- MORIANA, A.; VILLALOBOS, F.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 3, p. 395-405, 2002.



- NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187-1203, 2005.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest management science**, v. 67, n. 3, p. 341-351, 2011.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999.
- PERGO, É. M.; ABRAHIM, D.; DA SILVA, P. C. S.; KERN, K. A.; DA SILVA, L. J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E. L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 4, p. 499-507, 2008.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.
- POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Manag Sci**, v. 64, n. 4, p. 360-5, Apr 2008.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M. N.; BONJARDIM, L. R.; SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 619-624, 8/1/ 2008.
- RAI, V.; GUPTA, S.; SINGH, B. Volatile monoterpenes from *Prinsepia utilis* L. leaves inhibit stomatal opening in *Vicia faba* L. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 1, p. 121-124, 2003.
- RAJESWARA RAO, B. R.; KAUL, P. N.; SYAMASUNDAR, K. V.; RAMESH, S. Water soluble fractions of rose-scented geranium (Pelargonium species) essential oil. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 3, p. 243-246, 9// 2002.
- REIGOSA, R.; JOAQUÍN, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. S. **Allelopathy : a physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006.
- REIS, B. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L. Merrill, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L. 2011. 42 (mestrado). Programa de pós graduação em agronomia,

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.

ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 1, p. 303-313, 2000.

ROSADO, L.; RODRIGUES, H.; PINTO, J.; CUSTÓDIO, T.; PINTO, L.; BERTOLUCCI, S. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 422-428, 2009.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 55, n. 1, p. 134, 1966.

SPECOS, M. M.; GARCÍA, J.; TORNESELLO, J.; MARINO, P.; DELLA VECCHIA, M.; TESORIERO, M. D.; HERMIDA, L. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 10, p. 653-658, 2010.

SALAMCI, E.; KORDALI, S.; KOTAN, R.; ÇAKIR, A.; KAYA, Y. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 9, p. 569-581, 2007.

SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 295-306, 2003.

SENADO, A. Brasileiro ingere 5 kg de agrotóxicos por ano. 2012. Disponível em: <  
<http://www12.senado.gov.br/noticias/materias/2012/11/08/brasileiro-ingere-5kg-de-agrotoxicos-por-ano>>.

SETIA, N.; BATISH, D.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 63-67, 2007.

SINGH, H.; BATISH, D.; SETIA, N.; KOHLI, R. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of applied biology**, v. 146, n. 1, p. 89-94, 2005.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K.  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2006.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R. K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 2, p. 111-116, 2002.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 347-350, 2002.

STEENHUISEN, S. L.; RAGUSO, R. A.; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, Sep 20 2012.

SVENSSON, G. P.; PELLMYR, O.; RAGUSO, R. A. Pollinator attraction to volatiles from virgin and pollinated host flowers in a yucca/moth obligate mutualism. **Oikos**, v. 120, n. 10, p. 1577-1583, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5th Ed. 2012.

THEIS, N.; RAGUSO, R. A. The effect of pollination on floral fragrance in thistles. **J Chem Ecol**, v. 31, n. 11, p. 2581-600, Nov 2005.

TREZZI, M. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, n. 5, p. 1075-1082, 2009.

UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2009.

VICKERS, C. E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M. T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 5, p. 283-291, 2009.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: II – Distribuição geográfica e caracterização genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **Agrociência**, v. 10, p. 461-465, 2004.

WILEY-REGISTRY. **8th Edition with NIST 05 MS Spectra, Revision 2005 D.06.00, Agilent Technologies**. 2007.

ZANARDO, D. I. L.; LIMA, R. B.; FERRARESE, M. D. L. L.; BUBNA, G. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 25-30, 2009.

### CAPÍTULO 3

Efeito dos monoterpenos citrionelol, citrionelal e geraniol sobre as variáveis de trocas gasosas, fluorescência, viabilidade celular e mitocôndria de *Euphorbia heterophylla* L.

## Abstract

The goal of this study is to evaluate the effect of monoterpenes citronellal, citronellol and geraniol on the variables of gas exchange, fluorescence and cell damage in *Euphorbia heterophylla*. For the evaluation of gas and fluorescence changes, two plants per pots (1.5 L) were sprayed with 10 mL per pot of the following treatments: citronellal, citronellol and geraniol in concentrations from 0.1 to 0.6% (v/v) and water and DMSO (2%, v / v) as controls. The terpenes were diluted in 2% DMSO (v/v). We determined the variables: net CO<sub>2</sub> assimilation (A), stomatal conductance (gs), transpiration (E) and intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci), instantaneous CO<sub>2</sub> assimilation (A/C), intrinsic water use efficiency (A/g<sub>s</sub>), water use efficiency (A/E), the transpiration/stomatal conductance (E/g<sub>s</sub>), minimum fluorescence (F<sub>o</sub>), maximal fluorescence (F<sub>m</sub>), potential quantum efficiency of photosystem II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) minimal fluorescence in the light adapted state (F<sub>o</sub>' ), maximum fluorescence in a state adapted to light (F<sub>m</sub>' ), effective quantum efficiency of PSII (Yield). For fluorescence microscopy experiments and electron microscopy of transmission (MET) Fifty seeds were placed in Petri dishes containing 10 ml of the following treatments: control consisting of DMSO 20,000 uL L<sup>-1</sup>, citronellal 1000 uL L<sup>-1</sup>, citronellol 350 uL L<sup>-1</sup>, geraniol L<sup>-1</sup> 450 uL, essential oil of citronella 1800 uL L<sup>-1</sup> and eucalyptus essential oil cinerea 4400 uL L<sup>-1</sup>. The plates were placed in BOD germination chamber with 12h photoperiod and temperature adjusted to 25 ° C.

In general, the terpenoids significantly affected all variables of gas exchange and fluorescence, dramatically reducing net CO<sub>2</sub> assimilation. As it was possible to visualize the cellular and mitochondrial damage caused by treatments. Thus, the tested terpenoids have great potential for use as bioherbicides. However, there is need for more detailed studies, field-level to that definitive conclusions can be obtained

*Keywords:* Allelopathy, cell damage, net CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthesis

## Resumo

O objetivo desse trabalho é verificar o efeito dos monoterpenos citronelal, citronelol e geraniol sobre as variáveis de trocas gasosas, fluorescência e danos celulares em plantas de *Euphorbia heterophylla*. Para a avaliação das trocas gasosas e fluorescência, as duas plantas de *E. heterophylla* em vasos (1,5L) foram pulverizadas com 10 mL por vaso dos seguintes tratamentos: citronelal, citronelol e geraniol nas concentrações de 0,1 a 0,6% (v/v) e água e DMSO (2%, v/v) utilizados como controles. Os terpenos foram diluídos em DMSO 2% (v/v). Foram determinadas as variáveis: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), assimilação instantânea de CO<sub>2</sub> (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/g<sub>s</sub>), eficiência do uso da água (A/E), relação transpiração/condutância estomática (E/g<sub>s</sub>), fluorescência mínima (F<sub>o</sub>), fluorescência máxima (F<sub>m</sub>), eficiência quântica potencial do fotossistema II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), fluorescência mínima em estado adaptado a luz (F<sub>o</sub>'), fluorescência máxima em estado adaptado a luz (F<sub>m</sub>'), eficiência quântica efetiva do FSII (Yield). Para os experimentos de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (MET), cinquenta sementes foram dispostas em placas de Petri contendo 10 mL dos seguintes tratamentos: controle constituído de DMSO 20000 µL L<sup>-1</sup>, citronelal 1000 µL L<sup>-1</sup>, citronelol 350 µL L<sup>-1</sup>, geraniol 450 µL L<sup>-1</sup>, óleo essencial de citronela 1800 µL L<sup>-1</sup> e óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* 4400 µL L<sup>-1</sup>. As placas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12h e temperatura ajustada a 25°C.

De maneira geral, os terpenoides afetaram significativamente todas as variáveis de trocas gasosas e fluorescência, reduzindo drasticamente a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Assim como foi possível visualizar os danos celulares e mitocondriais causados pelos tratamentos, os terpenoides testados apresentam grande potencial para serem utilizados como bioherbicidas. Entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados, em nível de campo para que conclusões definitivas possam ser obtidas

Palavras-chave: Alelopata. Dano celular. Assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Fotossíntese.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso rotineiro de herbicidas sintéticos tem gerado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, gerarem risco para a fauna silvestre e contaminarem os alimentos que entram na dieta humana. Há necessidade de superar os paradigmas a respeito do controle de plantas daninhas, buscando métodos que sejam eficientes no controle e que respeitem os interesses da sociedade e os recursos naturais (GRANA *ET AL.*, 2012).

O Brasil desponta na lista de maiores consumidores de agrotóxicos per capita do mundo com 5,2 kg por habitante, que representa 9 bilhões de dólares, causando problemas ambientais irreversíveis (SENADO, 2012).

Os casos de resistência das plantas daninhas, aliados à utilização indiscriminada de um ou alguns herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, dificultam cada vez mais o controle destas plantas daninhas, que pode acarretar em significativo aumento no custo de produção da cultura. A utilização de um único mecanismo de ação seleciona indivíduos resistentes (EMBRAPA, 2012).

A resistência aos princípios ativos largamente utilizados como o glifosato está relacionada à utilização da soja transgênica resistente ao glifosato (Soja RoundupReady®), que, devido à pressão de seleção gerada pela utilização contínua de uma única molécula, seleciona populações resistentes de diversas espécies ao redor do mundo (POWLES, 2008).

O método de controle químico, pela facilidade e eficácia, quando comparado aos outros métodos que se tornam inviáveis pela escassez de mão de obra e/ou alto custo econômico, ainda é predominante. A utilização de aleloquímicos aproveitaria todo o maquinário utilizado no controle químico e reduziria os problemas ambientais, além de disponibilizar outras moléculas e até novos mecanismos de ação para o controle de plantas daninhas resistentes. Assim, a alelopatia, além de facilitar o entendimento das interações biológicas nos ecossistemas, pode ser diretamente empregada na agricultura.

O herbicida glifosato é considerado como levemente tóxico (OSWEILER, 1998; DE AMARANTE JUNIOR *ET AL.*, 2002; MESQUITA *ET AL.*, 2012) por apresentar valores de  $DL_{50}$  2000 mg  $kg^{-1}$  via oral em ratos (WILLIAMS *ET AL.*, 2000) e 1600 mg  $kg^{-1}$  para camundongos (BABABUNMI *ET AL.*, 1978). Entretanto, outros estudos demonstram que a dose mínima efetiva para outras variáveis pode ser muito menor, como para causar alterações em medula óssea de ratos (135 mg  $kg^{-1}$ ) (WILLIAMS *ET AL.*, 2000). Outros autores descrevem que mesmo

considerado como levemente tóxico, o glifosato causa sinais transitórios de irritação dermal e ocular após a exposição de cães em gramados recém tratados (GFELLER E MESSONNIER, 2004). Outra característica importante é que, mesmo possuindo  $DL_{50}$  relativamente grande, a dose diária aceitável para o glifosato é relativamente baixa ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), demonstrando que, nestas doses, em ratos, o glifosato causou perda de peso, descarga nasal, desordens digestivas e morte de matrizes grávidas (USFUMIGATION.ORG, 2015). Outro estudo indica que após dois anos, ratos tratados com milho geneticamente modificado com resíduos de glifosato e milho convencional com resíduos de glifosato apresentaram distúrbios nos rins, fígado, glândula pituitária e maior incidência de tumores de mamarírios quando comparados ao controle (SÉRALINI ET AL., 2012).

O glifosato ( $DL_{50} 2000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), com sua baixa toxicidade, é uma exceção quando comparado com outros herbicidas, como o paraquat ( $DL_{50} 46 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (BUS ET AL., 1976), arsenal (imazapyr) ( $DL_{50} 262 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e o surfactante nonylphenol ( $DL_{50} 76 \text{ ml kg}^{-1}$ ) utilizado em herbicidas (GRISOLIA ET AL., 2004) que são altamente tóxicos. Estes valores quando comparados aos dos óleos essenciais, como de *Eucalyptus citriodora* ( $DL_{50} 4153 \text{ mg kg}^{-1}$  para ratos) (MACEDO ET AL., 2011) e geraniol ( $DL_{50} 3600 \text{ mg kg}^{-1}$  para ratos), evidencia a baixa toxicidade dos óleos essenciais e seus constituintes para animais. Outra comparação importante é que além da alta  $DL_{50}$ , o geraniol tem uma dose subcrônica diária alta ( $1000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (LAPCZYNSKI ET AL., 2008) que, quando comparada com a do glifosato ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), destaca ainda mais as vantagens na utilização de bioherbicidas em relação a segurança alimentar, meio ambiente e para os próprios agricultores.

Outro ponto importante é a permanência das moléculas de herbicida no ambiente, principalmente no solo, onde foram encontradas altas concentrações de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), cuja meia vida pode chegar a 958 dias (DE SOUZA ET AL., 2006). Também foram encontrados resíduos destes compostos em folhagens novas, na colheita e em animais usados na alimentação humana (DE AMARANTE JUNIOR ET AL., 2002).

Resíduos de agrotóxicos, por serem solúveis em água, normalmente chegam aos rios e finalmente ao mar. Isto é preocupante, uma vez que os peixes e invertebrados aquáticos são os mais sensíveis ao glifosato. De acordo com o estudo que testou diversos herbicidas, o glifosato foi o segundo herbicida mais tóxico para bactérias e fungos, além de apresentar efeitos adversos em invertebrados do solo e ácaros (DE AMARANTE JUNIOR ET AL., 2002). Quando comparado aos terpenoides, que, por serem altamente voláteis, não permanecem no



ambiente, a contaminação ambiental dos herbicidas comerciais é muito maior, até pela necessidade de estabilização das moléculas comerciais, que aumenta a meia vida no meio ambiente.

Assim, o desenvolvimento de bioherbicidas não só ajudará no manejo, como na preservação do meio ambiente e na melhoria da qualidade do produto final que chega ao consumidor, reduzindo os resíduos de agrotóxicos.

O objetivo desse trabalho é verificar o efeito dos monoterpenos citronelal, citronelol e geraniol sobre as variáveis de trocas gasosas, fluorescência e danos celulares em plantas de *Euphorbia heterophylla*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os estudos sobre os metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, visando à obtenção e identificação de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e utilização em indústrias (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

O avanço das técnicas de identificação de moléculas abriu caminho para o estudo do metabolismo secundário de plantas que vem crescendo muito nos últimos 60 anos (BOURGAUD *ET AL.*, 2001). Graças ao avanço das técnicas bioquímicas e da biologia molecular, o estudo do efeito dos metabólitos secundários trouxe um entendimento mais claro da sua importância na adaptação das plantas com o meio ambiente (BOURGAUD *ET AL.*, 2001).

Os compostos secundários são classificados de acordo com sua rota de síntese e podem ser divididos em três grandes grupos, sendo eles os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (BOURGAUD *ET AL.*, 2001; TAIZ E ZEIGER, 2012).

É comum se encontrar em plantas, monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, mais conhecidos como óleos essenciais, os quais conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade (DUDAI *ET AL.*, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2012).

Os terpenoides possuem funções importantes na vida das plantas agindo como atrativos de polinizadores (PICHESKY E GERSHENZON, 2002; THEIS E RAGUSO, 2005; SVENSSON *ET AL.*, 2011; STEENHUISEN *ET AL.*, 2012), atuando na sinalização em resposta aos patógenos (HUANG *ET AL.*, 2003; LERDAU E GRAY, 2003), sinalização em resposta ao ataque

de herbívoros (BALDWIN E PRESTON, 1999; PARÉ E TUMLINSON, 1999; SCHMELZ *ET AL.*, 2003), atrativo de inimigos naturais de herbívoros (PARÉ E TUMLINSON, 1999; UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação repelente contra herbívoros (UNSICKER *ET AL.*, 2009), ação inseticida (LABINAS E CROCOMO, 2002), ação bactericida (INOUE *ET AL.*, 2004), ação nematocida (NTALLI *ET AL.*, 2010; NTALLI *ET AL.*, 2011), e em resposta aos estresses abióticos (VICKERS *ET AL.*, 2009). Outro efeito importante dos terpenoides é seu efeito alelopático sobre as plantas, apresentando inibição da germinação e crescimento (ROMAGNI *ET AL.*, 2000; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2007), redução do teor de clorofila (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2006; SETIA *ET AL.*, 2007), redução da respiração (ABRAHIM *ET AL.*, 2000; SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002), redução da taxa de divisão celular (ROMAGNI *ET AL.*, 2000), quebra da integridade da membrana celular (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007), inibição da abertura estomática (RAI *ET AL.*, 2003), inibição da síntese de DNA (NISHIDA *ET AL.*, 2005) além de causar estresse oxidativo (SINGH *ET AL.*, 2006; HE *ET AL.*, 2009) e injúrias foliares (SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007).

Dentre os compostos secundários, os terpenos voláteis, constituintes dos óleos essenciais, têm reconhecido efeito alelopático e constituem a maior classe de produtos secundários (DUDAI *ET AL.*, 1999). Os terpenoides são biossintetizados pela rota do ácido mevalônico a partir de três moléculas de acetil CoA, resultando, no final do ciclo em isopentenil difosfato (IPP). Através da rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre no cloroplasto e outros plastídios, na qual a partir de gliceraldeído 3-fosfato e piruvato, resulta no final do ciclo em dimetialil difosfato (DMAPP). O IPP e seu isômero DMAPP são moléculas básicas na formação dos terpenoides, tais compostos contendo 5 carbonos reagem formando geranyl difosfato (C<sub>10</sub>), molécula que origina quase todos os monoterpênicos conhecidos, a adição de mais um IPP ou DMAPP produz farnesil difosfato (C<sub>15</sub>), precursor da maioria dos sesquiterpenos (PARÉ E TUMLINSON, 1999; VICKERS *ET AL.*, 2009; LUIZA ISHII-IWAMOTO *ET AL.*, 2012; TAIZ E ZEIGER, 2012).

A partir do geranyl difosfato (GPP), precursor de quase todos os monoterpênicos, a enzima geraniol sintase produz geraniol (álcool) (BAIRD *ET AL.*, 2014), que é convertido diretamente em citrolel (álcool), que, por sua vez, sofre oxidação para formar citronelal (aldeído) em *Cymbopogon winterianus*. Não há evidências de que o citronelol é convertido em geraniol, e não existem enzimas ativas para conversão de aldeídos (citraonal) de volta a álcoois (citraonal e geraniol) nessa espécie de planta (AKHILA, 1986).

Observa-se grande variação, na resposta biológica, em pequenas modificações moleculares, como os apresentados anteriormente (Capítulo 2), entre os tratamentos citronelal, citronelol e geraniol. Nota-se que a diferença entre as moléculas é pequena (Figura 1), entretanto, a implicação prática é grande.

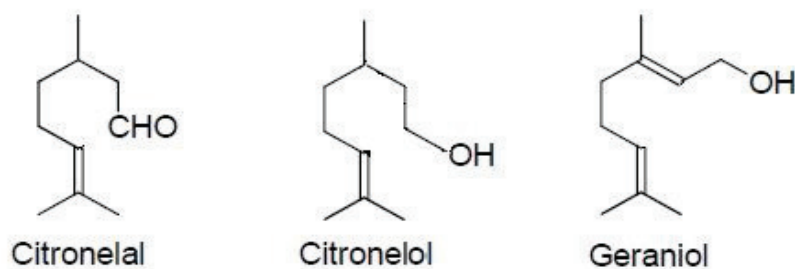


Figura 1: Estrutura molecular dos monoterpenos citronelal, citronelol e geraniol.

Dentre as pequenas diferenças entre as moléculas, quanto a suas propriedades eletrônicas e estruturais, observa-se correlação entre lipofilicidade e  $DL_{50}$  e  $DL_{99}$  de larvas de mosquito *Aedes aegypti*, demonstrando que quanto maior a lipofilicidade, maior o efeito biológico dos terpenoides. Entretanto, as propriedades eletrônicas, aparentam ser mais importantes que as estruturais, correlacionando a eficiência de recepção de elétrons, com maior atividade biológica, sugerindo um possível mecanismo de transferência de cargas com o receptor biológico (SANTOS *ET AL.*, 2009). Destaca-se nestes resultados, que o citronelal apresentou menor lipofilicidade, eficiência de recepção de elétrons e, conseqüentemente, menor efeito biológico que o geraniol (SANTOS *ET AL.*, 2009).

A lipofilicidade é uma característica importante dos óleos essenciais, pois permite sua passagem através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios. Esse processo altera a permeabilidade dessas organelas, resultando na perda da função e até morte celular (LORBER E MULLER, 1976; LAMBERT *ET AL.*, 2001; BURT, 2004; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007; BAKKALI *ET AL.*, 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Condução do experimento em vasos

As sementes de *E. heterophylla* foram dispostas em vasos (1,5L) com substrato orgânico (Mecplant®) contendo vermiculita e conduzidos em casa de vegetação. O desbaste deixando-se duas plantas por vaso foi realizado aos 10 dias após a semeadura. No trigésimo dia, foram pulverizados 10 mL por vaso dos seguintes tratamentos: citronelal, citronelol e geraniol nas concentrações de 0,1 a 0,6% (v/v) e água e DMSO (2%, v/v) utilizados como controles. Os terpenos foram diluídos em DMSO 2% (v/v).

#### 3.2. Análise das variáveis de trocas gasosas

As variáveis de trocas gasosas das plantas de *E. heterophylla* foram feitas com auxílio do analisador de gás infravermelho (IRGA, ADC, modelo LCI Pro, Hoddesdon, UK). Foram determinadas as variáveis: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). A irradiância da fonte de luz acoplada foi  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Através dos dados de  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$ , foi obtida a assimilação imediata/instantânea de CO<sub>2</sub> através da razão  $A/C_i$ , a eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ), eficiência do uso da água ( $A/E$ ) e relação transpiração/condutância estomática ( $E/g_s$ ). As análises de trocas gasosas foram realizadas sempre na porção mediana de duas folhas mais jovens completamente expandidas e não destacadas em cada planta, entre 7 e 11h da manhã, período de maior taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ) (MORIANA ET AL., 2002).

#### 3.3. Determinação da fluorescência da clorofila *a* e fluorescência durante a fotossíntese

Os valores de fluorescência mínima ( $F_o$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ) e o rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) foram obtidos com a utilização de fluorímetro portátil de luz modulada (Opti-Sciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA). As determinações de fluorescência da clorofila *a* adaptadas ao escuro foram medidas após aclimação das folhas ao escuro (~ 5 min) com auxílio de presilhas de plástico. Para a fluorescência durante a

fotossíntese, foi acoplado o fluorímetro ao IRGA após as leituras da fotossíntese e as variáveis obtidas foram fluorescência mínima ( $F'o$ ), fluorescência máxima ( $F'm$ ) e eficiência quântica do fotossistema II sob condições fotossintéticas (Yield). Foram realizadas duas leituras em cada planta, sempre na porção mediana de duas folhas mais jovens completamente expandidas não destacadas em todas as avaliações (WEISS E REIGOSA, 2001).

### 3.4. Microscopia de fluorescência

#### 3.4.1. Germinação e tratamentos

Cinquenta sementes foram dispostas em placas de Petri forradas com duas folhas de papel *germitest* contendo 10 mL dos seguintes tratamentos: controle constituído de DMSO  $20000 \mu\text{L L}^{-1}$  (2%, v/v), citronelal  $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ , citronelol  $350 \mu\text{L L}^{-1}$ , geraniol  $450 \mu\text{L L}^{-1}$ , óleo essencial de citronela  $1800 \mu\text{L L}^{-1}$  e óleo essencial de eucalipto cinerea  $4400 \mu\text{L L}^{-1}$ . As placas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12h e temperatura ajustada a  $25^\circ\text{C}$ .

Após 96 horas, os ápices radiculares foram seccionados e imersos por 5 segundos na solução de trabalho composta por 1 mL de solução de iodeto de propídio ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  em água) e  $20 \mu\text{L}$  de solução de diacetato de fluoresceína ( $5 \text{ g L}^{-1}$  de acetona PA) (HUANG *ET AL.*, 1986).

#### 3.4.2. Microscopia e fotografia

Os ápices foram visualizados (Axioskop 2 plus fluorescence microscope, Carl Zeiz) e fotografados (AxioCam MRC high-resolution câmera, Carl Zeizz) nos primeiros 3 minutos após a imersão na solução de trabalho. As imagens foram obtidas pelo método de dupla exposição: a amostra foi exposta a luz verde usando o filtro rhodamine combinada com refletor 580 e filtros 510 – 560 nm. Em seguida, a amostra foi iluminada com luz azul usando a combinação de filtros FITC e KP560 para a obtenção da segunda imagem. As imagens foram transferidas para o computador usando o programa Axio Vision Rel software (v. 4.6) e analisadas utilizando o programa Image-Pro Plus (v. 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (HUANG *ET AL.*, 1986).

### 3.5. Microscopia eletrônica de transmissão

#### 3.5.1. Emblocamento

Cinquenta sementes foram dispostas 50 em placas de Petri forradas com duas folhas de papel *germitest* contendo 10 mL dos seguintes tratamentos: controle constituído de DMSO 20000 ( $\mu\text{L L}^{-1}$  (2%, v/v)), citronelal 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , citronelol 350  $\mu\text{L L}^{-1}$  e geraniol 450  $\mu\text{L L}^{-1}$ . As placas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD com fotoperíodo de 12h e temperatura ajustada a 25°C. Após 120 horas, os ápices radiculares (1 – 2 mm) foram seccionados e imersos em solução de fixação composta de glutaraldeído 5% (v/v) em tampão fosfato (pH 7,2) e armazenados a 4°C. Posteriormente, os ápices foram lavados a cada 4 horas em tampão fosfato (pH 7,2) por três vezes. Imersos em tetróxido de ósmio 2% (v/v) por 3 horas, acetato de uranila 2% (v/v) em acetona 10% por 1 hora. A desidratação foi realizada em acetona 50%, duas vezes de 30 minutos, acetona 75%, duas vezes de 60 minutos, acetona 80%, duas vezes de 60 minutos, acetona 95%, duas vezes de 60 minutos e acetona 100%, duas vezes de 120 minutos. Impregnação em resina Spurr em solução de Spurr e acetona na proporção 1:3 por 120 minutos, por três vezes, Spurr e acetona 1:1 por 120 minutos, por três vezes, Spurr e acetona 3:1 por 120 minutos, por duas vezes e Spurr e acetona 3:1 por 180 minutos. A inclusão em resina Spurr foi realizada através da imersão das amostras em resina por 180 minutos, por quatro vezes, todos os passos anteriores foram realizados em temperatura de 4°C. As amostras foram colocadas nos moldes em resina Spurr pura e acondicionadas em estufa de secagem a 60°C por 72 horas.

Os blocos foram piramidados e cortados em ultramicrotomo (PowerTome X, RMC products by Boeckeler) a 65 nm, os cortes foram coletados em grids e contrastados com acetato de uranila (50 g L<sup>-1</sup>) por 30 minutos, lavados em água destilada corrente por 2 minutos, contrastados com solução de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 12 minutos e lavados novamente em água destilada corrente por 2 minutos (DÍAZ-TIELAS *ET AL.*, 2012).

#### 3.5.2. Obtenção das imagens (MET)

As imagens foram realizadas com microscópio eletrônico de transmissão operado a 80 kV (JEOL - JEM 1400 electronmicroscope).

### 3.6. Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi blocos casualizado com 5 repetições. Os dados foram submetidos a ANOVA e as variáveis significativas analisadas por regressão polinomial ( $p < 0,05$ ) pelo programa SISVAR (5.1). Os gráficos foram obtidos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeitos dos monoterpenos sobre as trocas gasosas em plantas adultas de *E. heterophylla*

A aplicação dos monoterpenos, citronelal, citronelol e geraniol afetou fortemente as variáveis fotossintéticas, assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  (A), carboxilação instantânea de  $\text{CO}_2$  (A/Ci), condutância estomática (gs), transpiração (E), eficiência do uso da água (A/E), concentração interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) e a relação transpiração/condutância estomática (E/gs) (Figura 2). Entretanto, observa-se que os dois terpenoides álcoois (citronelol e geraniol) afetaram em maior proporção as variáveis de trocas gasosas quando comparada ao terpenoide aldeído citronelal (Figura 2). Estas diferenças se intensificaram principalmente nas maiores concentrações dos terpenoides (0,4 a 0,6%).

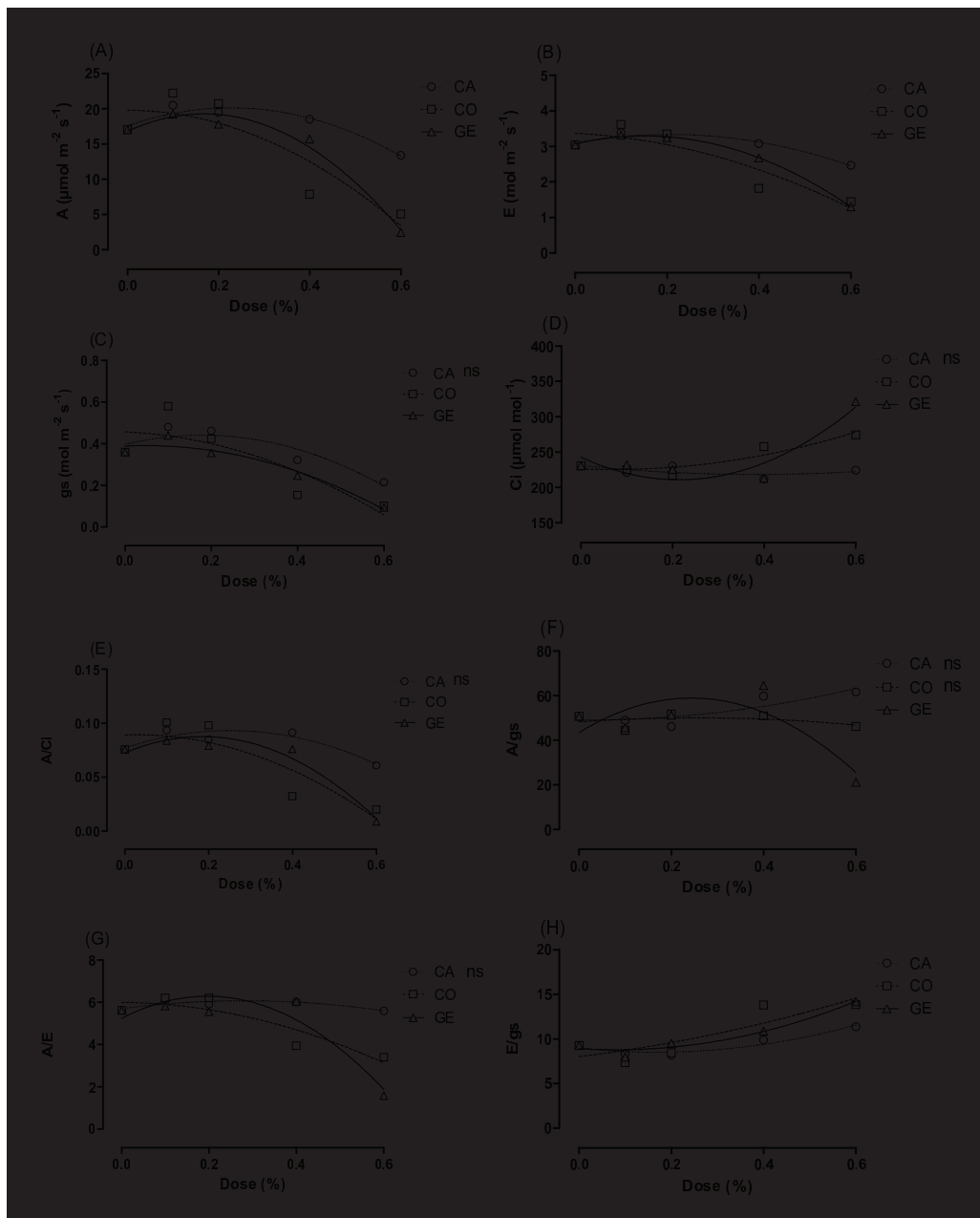


Figura 2: Efeito dos terpenos sobre a (A) assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), (B) transpiração (E), (C) condutância estomática (gs), (D) concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), (E) carboxilação instantânea de CO<sub>2</sub> (A/Ci), (F) eficiência intrínseca do uso da água (A/g<sub>s</sub>), (G) eficiência do uso da água (A/E) e (H) relação transpiração/condutância estomática (E/g<sub>s</sub>) de plantas adultas de *E. heterophylla*. NS - Regressão polinomial de segundo grau não significativa (p<0,05). CA - citronelal, CO - citronelol e GE - geraniol.

A assimilação líquida (A) e a transpiração (E) foram drasticamente reduzidas especialmente quando o citronelol e o geraniol foram utilizados (Figura 2A e 2B). As taxas



fotossintéticas aproximaram-se de zero na dose de 0,6%, em ambos os terpenoides. A redução da taxa fotossintética poderia ser explicada pela redução na condutância estomática, uma vez que com menor abertura estomática há maior limitação no influxo de CO<sub>2</sub>. Entretanto, observa-se que a concentração de CO<sub>2</sub> interna (C<sub>i</sub>) aumentou e a relação A/C<sub>i</sub> reduziu, indicando que não houve, a princípio, limitação na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Além disso, percebe-se que a condutância estomática (g<sub>s</sub>) foi mais afetada que a transpiração (E), evidenciada pelo aumento na relação E/g<sub>s</sub>. Dessa forma, observa-se que a fotossíntese também foi mais afetada que a transpiração, sendo confirmado pelos valores decrescentes da eficiência do uso da água (A/E) à medida que se aumentou as doses dos óleos essenciais (exceção para CA). A redução significativa da eficiência intrínseca do uso da água (A/g<sub>s</sub>) e da eficiência do uso da água (A/E) novamente indica que a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) foi afetada diretamente, e, neste caso, não foi influenciada pelo fechamento estomático, uma vez que a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) e a carboxilação instantânea de CO<sub>2</sub> (A/C<sub>i</sub>) foram mais afetadas que a condutância estomática (g<sub>s</sub>) e a transpiração (E).

O aumento significativo da relação transpiração/condutância estomática (E/g<sub>s</sub>) indica que a transpiração (E) não foi proporcionalmente afetada em relação à condutância estomática (g<sub>s</sub>), podendo indicar incremento na transpiração cuticular, uma vez que a abertura estomática foi menor. A transpiração cuticular pode ser resultante de danos superficiais diretos causados pela pulverização 12 horas antes da obtenção dos dados de trocas gasosas. Ainda, deve-se levar em consideração que as plantas tratadas com citronelal, citronelol e geraniol nas doses de 0,4 e 0,6% (v/v) apresentaram necrose generalizada nas folhas 24h após a aplicação, impedindo inclusive qualquer medida de troca gasosa. Dessa forma, pode-se sugerir que danos severos à membrana podem ter contribuído para o aumento da relação E/g<sub>s</sub>.

A redução na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) pode ser causada por restrições na fase bioquímica e fotoquímica (DO CARMO ARAÚJO E DEMINICIS, 2009; TAIZ E ZEIGER, 2012). A redução da taxa fotossintética com o aumento de C<sub>i</sub> e redução da carboxilação instantânea (A/C<sub>i</sub>) indicam que os danos podem ter ocorridos na fase fotoquímica e/ou na fase bioquímica. Danos na fase fotoquímica, especialmente na membrana, trariam como consequência redução na disponibilidade de compostos redutores como o NADPH e o ATP, substratos obrigatórios para o funcionamento da fase reductiva do carbono fotossintético. Por outro lado, danos/alteração na fase bioquímica poderiam causar acúmulo de CO<sub>2</sub> interno (C<sub>i</sub>) e dos compostos redutores, causando consequências diversas, entre elas, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Diversos estudos demonstram que óleos essenciais

geram estresse oxidativos em plantas (PERGO *ET AL.*, 2008; KAUR *ET AL.*, 2012), aumentando a peroxidação lipídica, podendo alterar a integridade das membranas (SINGH *ET AL.*, 2006).

#### 4.2. Efeitos dos monoterpenos sobre as variáveis de fluorescência em plantas adultas de *E. heterophylla*

A fluorescência tem sido utilizada para identificar vários tipos de estresses bióticos e abióticos (RIBEIRO *ET AL.*, 2003; BAKER E ROSENQVIST, 2004). Quaisquer interferências no funcionamento das membranas dos tilacoides dos cloroplastos provocam mudanças importantes nas características dos sinais de fluorescência. Tais variáveis podem ser facilmente mensuradas com auxílio de aparelhos diretamente nas folhas de maneira não destrutiva, facilitando o entendimento do que ocorre com as plantas sob determinados estresses.

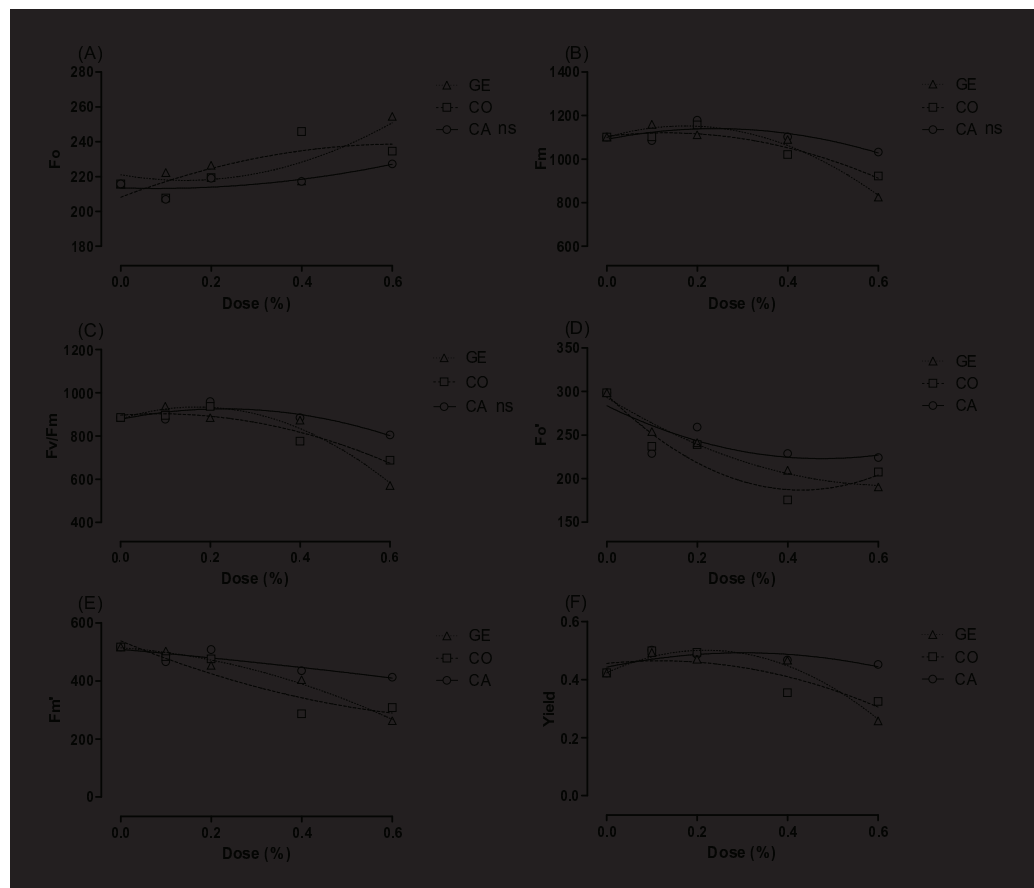


Figura 3: Efeito dos monoterpêneos sobre a fluorescência de *E. heterophylla*: (A) fluorescência mínima ( $F_o$ ), (B) fluorescência máxima ( $F_m$ ), (C) eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), (D) fluorescência mínima em estado adaptado a luz ( $F_o'$ ), (E) fluorescência máxima em estado adaptado a luz ( $F_m'$ ), (F) eficiência quântica efetiva do FSII (Yield). NS - Regressão polinomial de segundo grau não significativa ( $p < 0,05$ ). CA - citronelal, CO - citronelol e GE - geraniol.

Pode-se definir  $F_o$  como sendo a fluorescência mínima, representando a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila do complexo coletor de luz do fotossistema II (PSII) quando todos os centros de reação estão “abertos” e as quinonas A ( $Q_A$ ) estão totalmente oxidadas (KRAUSE E WEIS, 1991).

A fluorescência mínima ( $F_o$ ) sofreu incremento significativo para os tratamentos citronelol e geraniol, não havendo diferença significativas para o citronelal (Figura 3A). Estes resultados foram semelhantes aos apresentados anteriormente (Capítulo 2), onde o citronelal demonstrou ser menos ativo que o citronelol e geraniol.

A fluorescência mínima ( $F_o$ ) não foi afetada significativamente pela aplicação de citronelal, sugerindo que não houve danos ao centro de reação do fotossistema II (PSII) e à capacidade de transferência de energia de excitação do complexo antena. Entretanto, o aumento significativo dos valores nos tratamentos com geraniol e citronelol evidencia um provável dano ao centro de reação do fotossistema II (PSII), que pode ter reduzido a capacidade de transferência de energia de excitação do complexo antena.

A variável  $F_m$  representa a fluorescência máxima potencial quando as quinonas A ( $Q_A$ ) estão reduzidas e os centros de reação são incapazes de aumentar as reações fotoquímicas. O citronelal não reduziu significativamente a fluorescência máxima ( $F_m$ ). Entretanto, observa-se redução significativa de  $F_m$  nos tratamentos geraniol e citronelol (Figura 3B). Estes resultados apontam que os centros de reação e as quinonas A ( $Q_A$ ), assim como o próprio fotossistema II (PSII) e seus complexos antena, podem ter sofrido danos, que repercutiria em redução na capacidade de absorção de fótons, na transmissão por ressonância de fluorescência, oxidação da água e/ou transporte de elétrons até quinona A ( $Q_A$ ).

A eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) é uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII quando todos os centros de reação estão abertos (BAKER E ROSENQVIST, 2004). Novamente aqui, não se observa diferença significativa com a aplicação de citronelal, entretanto, a aplicação de citronelol e geraniol causou reduções significativas (Figura 3C) da eficiência quântica potencial do fotossistema II

(Fv/Fm), sugerindo redução da eficiência do fotossistema II, que pode ter sido causada por danos significativos no centro de reação, na quinona A (Q<sub>A</sub>) e/ou alguma etapa anterior a cadeia transportadora de elétrons. Danos na membrana do tilacoide podem causar redução da eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm), fluorescência máxima (Fm) e fluorescência mínima (Fo) (DO CARMO ARAÚJO E DEMINICIS, 2009).

A eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) pode ser reduzida por diversos tipos de estresse, como, estresse por frio (BAKER *ET AL.*, 1983), estresse hídrico (ÖGREN E ÖQUIST, 1985), entre outros. No presente experimento, provavelmente a redução da eficiência quântica está relacionada à desestruturação dos fotossistemas. Vale ressaltar que os valores de fluorescência mínima (Fo), fluorescência máxima (Fm) e eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) são obtidos com a adaptação da planta ao escuro, enquanto os valores de fluorescência mínima em estado adaptado a luz (Fo'), fluorescência máxima em estado adaptado a luz (Fm') e eficiência quântica efetiva do FSII (Yield) são coletados com a planta aclimatada sob incidência de luz fotossintética, ou seja, quando a planta realiza fotossíntese. Ao aclimatar as plantas do escuro para a luz fotossintética, os centros de reação são progressivamente reduzidos (em poucos segundos), resultando em aumento da fluorescência da clorofila. Após este pico, a fluorescência decai em um fenômeno conhecido como extinção da fluorescência (*quenching*). Esse *quenching* pode ser fotoquímico ou não fotoquímico. O *quenching* fotoquímico ocorre quando os elétrons, provenientes da água, são transferidos do fotossistema II (PSII) para a produção de ATP e NADPH, em decorrência da ativação de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono. Simultaneamente, a energia do *quenching* fotoquímico é utilizada para a construção do gradiente eletroquímico, responsável pela síntese de ATP através da ATP-sintase. O *quenching* não fotoquímico é a perda de energia na forma de calor (MAXWELL E JOHNSON, 2000; BAKER E ROSENQVIST, 2004).

A fluorescência mínima em estado adaptado a luz (Fo') pode ser representada pela emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila a do complexo coletor de luz do fotossistema II quando parte dos centros de reação estão "fechados" e as quinonas A (Q<sub>A</sub>) estão parcialmente reduzidas pelo processo fotossintético em andamento. Assim, resultados inibitórios significativos de Fo' sugerem que a capacidade de transferência de energia dos complexos antena para os centros de reação foi afetada e/ou os centros de reação do fotossistema II (PSII) foram comprometidos (BOLHAR-NORDENKAMPF *ET AL.*, 1989).

Os três tratamentos apresentaram redução significativa na fluorescência em estado adaptado a luz (Fo') (Figura 3D), demonstrando que a capacidade de transferência de energia dos complexos antena para os centros de reação foi afetada e/ou os centros de reação do fotossistema II (PSII) foram comprometidos.

A fluorescência máxima em estado adaptado a luz (Fm') representa a fluorescência máxima real quando as quinonas A (Q<sub>A</sub>) estão parcialmente reduzidas e os centros de reação estão aclimatados a luz fotossintética.

Observa-se no presente experimento que o citronelal, citronelol e geraniol reduziram significativamente a fluorescência máxima em estado adaptado a luz (Fm'). Este resultado, mais uma vez, pode estar relacionado com possíveis danos ao fotossistema II (Figura 3E).

A eficiência quântica efetiva do fotossistema II (Yield) representa a eficiência quântica do fotossistema II sobre condições fotossintéticas. É uma estimativa da proporção efetiva de absorção de quanta utilizada nos centros de reação do fotossistema II (SCHREIBER *ET AL.*, 1995).

Observa-se que a eficiência quântica efetiva do FSII (Yield) apresentou redução significativa em todos os tratamentos (Figura 3F). Tal resultado sugere que pode ter ocorrido fechamento dos centros de reação e dissipação de calor pelo sistema antena causados pelo *quenching* não fotoquímico (GENTY *ET AL.*, 1989). Dessa forma, a redução significativa da eficiência quântica efetiva do FSII pode estar relacionada aos danos dos terpenoides nos centros de reação, pigmentos fotossintéticos e/ou ao próprio fotossistema II (PSII). A redução da capacidade de absorção de fótons pelo complexo antena pode ser resultado da diminuição dos teores de clorofila causados pelos terpenoides (KOHLI *ET AL.*, 1998; SINGH, H. P. *ET AL.*, 2002; SINGH, HARMINDER P. *ET AL.*, 2002; BATISH *ET AL.*, 2004; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2006; BATISH *ET AL.*, 2007; SETIA *ET AL.*, 2007; BATISH *ET AL.*, 2008) e/ou aumento do estresse oxidativo (SINGH *ET AL.*, 2006; HE *ET AL.*, 2009), que, por sua vez, pode causar danos aos carotenoides e/ou outras estruturas importantes para a captação (BARREIROS *ET AL.*, 2006).

A redução da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) (Figura 2A) causado pelos monoterpênos pode resultar da redução da captação e/ou transporte de elétrons do cloroplasto, reduzindo, assim, a disponibilidade dos substratos (ATP e NADPH) utilizados para a assimilação de CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin. Entretanto, a possível desestruturação da membrana causada pelos terpenoides (LORBER E MULLER, 1976; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007) poderia causar danos aos cloroplastos e/ou desnaturação das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin.

Além disso, a desestruturação das membranas acarretaria em colapso da cadeia transportadora de elétrons, possibilitando a formação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, que, por ser altamente reativo, ataca os ácidos graxos insaturados das membranas rapidamente, abrindo e desidratando as membranas e tecidos celulares, provocando colapso do sistema e, conseqüentemente, morte celular (MARTINS, 2013). O geraniol é mais lipofílico e possui maior eficiência de recepção de elétrons que o citronelal, que explicaria a maior atividade biológica dos álcoois (geraniol e citronelol). Tais propriedades sugerem um possível mecanismo de transferência de cargas com o receptor biológico (membrana) (SANTOS *ET AL.*, 2009). A lipofilicidade é uma característica importante dos terpenoides, pois permite sua passagem através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios. Esse processo altera a permeabilidade dessas organelas, resultando na perda da função e até morte celular (LORBER E MULLER, 1976; LAMBERT *ET AL.*, 2001; BURT, 2004; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007; BAKKALI *ET AL.*, 2008).

A redução da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) pode ser também conseqüência de danos ao fotossistema II e/ou I, impedindo a formação do gradiente eletroquímico entre o estroma e o lume do cloroplasto, uma vez que houve CO<sub>2</sub> disponível na câmara subestomática para a carboxilação (C<sub>i</sub>), e/ou a desestruturação da membrana, que também impediria a formação do gradiente eletroquímico, impossibilitando a fixação de CO<sub>2</sub> por falta de NADPH e ATP na fase bioquímica.

Mais uma vez a capacidade dos terpenoides de danificar a membrana celular (LORBER E MULLER, 1976; SINGH *ET AL.*, 2005; BATISH *ET AL.*, 2007) pode explicar a redução da transpiração (E) e da condutância estomática (g<sub>s</sub>). Uma vez danificada a membrana, as células guardas poderiam ser incapazes de acumular K<sup>+</sup> e outros solutos osmoticamente ativos para reduzirem seu potencial hídrico, fazendo com que as células guardas continuem murchas. Alguns estudos demonstraram que os monoterpenos constituintes do óleo essencial de *Prinsepia utilis* L. reduzem o poro estomático, condutância estomática (g<sub>s</sub>) e também o influxo de K<sup>+</sup> para as células guardas de *Vicia faba* L. (RAI *ET AL.*, 2003). Dessa forma, podem-se relacionar os resultados obtidos no experimento de trocas gasosas (Figura 2) e de fluorescência (Figura 3) com a inibição da germinação e crescimento de *E. heterophylla* (Capítulo 2). Os prováveis danos na membrana do tilacoide reduzem a capacidade de produção de NADPH e ATP pelo cloroplasto, que, conseqüentemente, reduzem a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Assim como o dano na membrana mitocondrial causa desacoplamento,

redução da fosforilação oxidativa e desfazimento do gradiente eletroquímico entre a matriz e o espaço intermembrana, desfazendo a força próton-motora necessária para a síntese de ATP pela ATP sintase (REIS, 2011), a redução do fornecimento de ATP, somados aos danos na membrana plasmática das células do embrião e meristemas, causaria a redução qualitativa e quantitativa das variáveis de germinação e crescimento.

#### 4.3. Experimento de fluorescência (viabilidade celular)

O diacetato de fluoresceína vem sendo amplamente utilizado em celular vegetais e protoplasma para monitorar a viabilidade celular (HESLOP-HARRISON E HESLOP-HARRISON, 1970; WIDHOLM, 1972; LARKIN, 1976). O princípio da coloração com diacetato de fluoresceína consiste nas moléculas de diacetato de fluoresceína não polar atravessarem a membrana plasmática e serem hidrolizadas no citoplasma para emitir fluorescência. A molécula resultante que emite fluorescência é polar e permanece no citoplasma por ser incapaz de atravessar a membrana (ROTMAN E PAPERMASTER, 1966; HESLOP-HARRISON E HESLOP-HARRISON, 1970). As células vivas podem ser distinguidas pelo brilho da fluorescência quando iluminadas com luz azul.

O iodeto de propídio, entretanto, não ultrapassa a membrana plasmática íntegra, corando células danificadas ao reagir com os fragmentos de DNA, emitindo fluorescência da cor vermelha ao ser exposta a luz verde, sendo assim, é amplamente utilizado em métodos de coloração para identificar células em apoptose e/ou danificadas (NICOLETTI *ET AL.*, 1991; MOORE *ET AL.*, 1998).

Dessa forma, pode-se distinguir qualitativamente a diferença entre o controle (DMSO) e os tratamentos citronelal, citronelol, geraniol, *E. cinerea* e *C. winterianus* (Figura 4). Assim como os resultados de inibição do crescimento (Capítulo 2), o citronelol apresentou o resultado mais marcante, sendo o tratamento com maior incidência de fluorescência vermelha. Isto indica que grande parte das células do ápice radicular de *E. heterophylla* foram danificadas (Figura 4C).

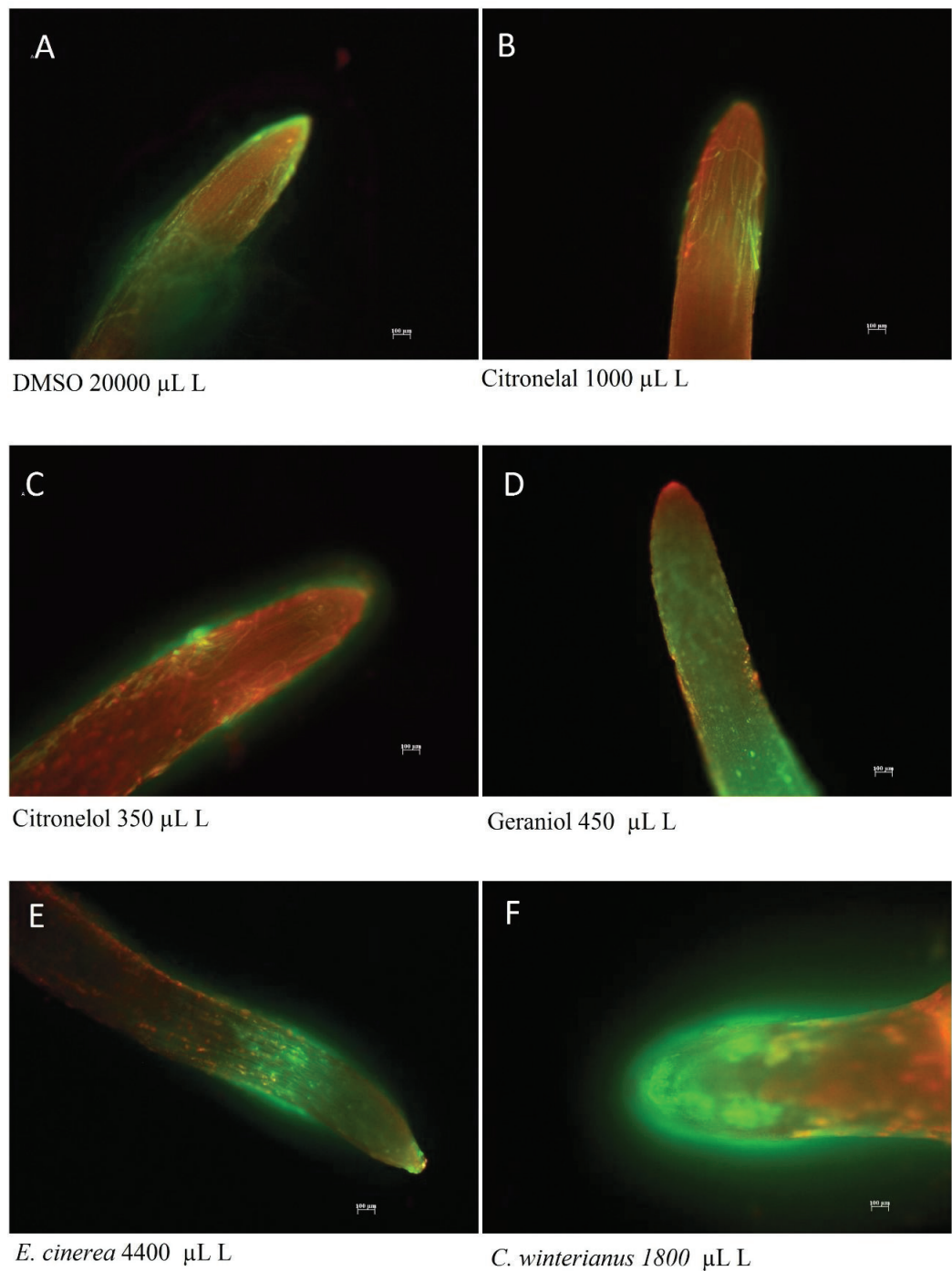


Figura 4: Ápices de *Euphorbia heterophylla* analisadas por microscopia de fluorescência: (A) controle – DMSO 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , (B) citronelal 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , (C) citronelol 350  $\mu\text{L L}^{-1}$ , (D) geraniol 450  $\mu\text{L L}^{-1}$ , (E) óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* 4000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* 1800  $\mu\text{L L}^{-1}$ .



O controle DMSO (Figura 4A) apresenta uma pequena região avermelhada. Nota-se que essa região é relativamente plana, não circundando totalmente o ápice radicular, que sugere que os danos podem ser causados pela manipulação e/ou contato do ápice com papel de germinação. Este fato parece ser verdade, uma vez que outras fotografias do controle não apresentaram regiões danificadas.

O citronelal (Figura 4B) apresenta danos celulares semelhantes aos causados pelo citronelol (Figura 4C), podendo ser identificado comprometimento tanto na região meristemática quanto na zona de alongamento celular. Os danos estendem-se ao redor dos ápices, indicando que estas alterações são causadas pelos tratamentos devido a uniformidade da coloração avermelhada.

O geraniol (Figura 4D) apresentou danos visíveis apenas na região meristemática, não aparentando ter causado danos significativos na região de alongamento celular.

Os óleos essenciais de *E. cinerea* e *C. winterianus* causaram danos aparentes apenas na região de alongamento celular, não sendo possível verificar danos celulares na região meristemática dos ápices de *E. heterophylla*.

Pode-se destacar aparente ausência de pelos radiculares nos tratamentos, sendo possível identificar grande quantidade destes no controle DMSO (Figura 4A). A redução da incidência de pelos pode ser reflexo do dano celular superficial causado pelos tratamentos, que acarretaria na ausência destas estruturas delicadas nos demais ápices.

#### 4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os cortes de ápices radiculares de *E. heterophylla* foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão (MET), tendo a mitocôndria como foco deste estudo, para visualizar possíveis alterações nas membranas mitocondriais.

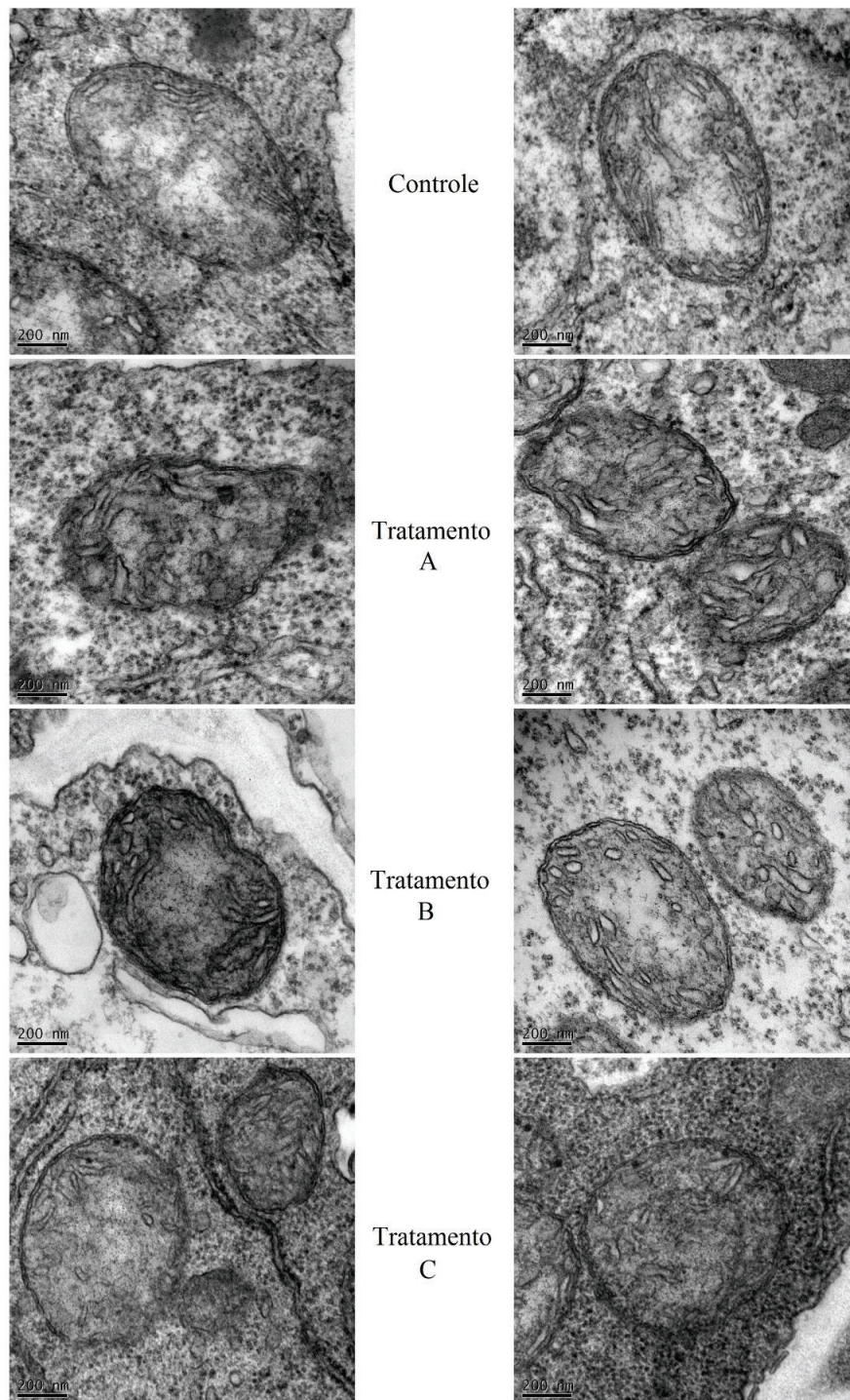


Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de ápices de *Euphorbia heterophylla*: controle – DMSO  $2000 \mu\text{L L}^{-1}$  e tratamentos constituídos de citronelal  $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ , citronelol  $350 \mu\text{L L}^{-1}$  e geraniol  $450 \mu\text{L L}^{-1}$ .

Podemos observar a forma ovoide do tratamento controle, que, quando comparado com os tratamentos, diferem na forma irregular e eletrodensidade, caracterizada pela coloração mais escura dos tratamentos. Resultados obtidos do efeito de diterpenos sobre a mitocôndria de larvas de *Aedes aegypti* (VALOTTO ET AL., 2011) identificaram alterações semelhantes.

A aparente desorganização das cristas mitocondriais e a redução da eletroluscência da matriz, assim como o aparente “murchamento” mitocondrial, indicam lesões na organela (STIGGER ET AL., 2001).

Fica evidente a característica fluida e perfeitamente lisa da membrana mitocondrial do controle, que, sem apresentar invaginações proeminentes, representa a mitocôndria íntegra e funcional. Por outro lado, os tratamentos afetaram a integridade da membrana mitocondrial, aparentando danos severos na membrana.

Deve-se ressaltar que foram utilizadas as DL<sub>50</sub> dos terpenoides encontrados nos testes de germinação (Capítulo 2), que sugere que a redução da atividade e/ou eficiência mitocondrial reduziram a produção de ATP, reduzindo, assim, a germinação de *E. heterophylla* L.

## 5. CONCLUSÕES

Os terpenoides reduziram a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, transpiração, condutância estomática, carboxilação instantânea de CO<sub>2</sub>, eficiência do uso da água, e aumentaram a concentração interna de CO<sub>2</sub> e a relação transpiração/condutância estomática.

Todas as variáveis de fluorescência foram afetadas pelo citronelol e geraniol.

O citronelal afetou a fluorescência mínima em estado adaptado a luz, fluorescência máxima em estado adaptado a luz e a eficiência quântica efetiva do FSII.

Os ápices radiculares de *E. heterophylla* apresentaram danos celulares superficiais com a aplicação de citronelal, citronelol, geraniol, óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* e óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

Os terpenoides causaram danos na membrana mitocondrial.

O citronelal demonstrou-se menos efetivo para utilização como bioherbicida que o citronelol e geraniol.

## 6. REFERÊNCIAS

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

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois, USA: Allured publishing corporation, 1995. ISBN 0931710855.

AKHILA, A. Biosynthesis of monoterpenes in *Cymbopogon winterianus*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 421-424, 1986.

AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PIZZO, I. V.; SCHIAVETTO, A. R. Weed Response on Fusel Oil Applied at Initial and Late Post-Emergence. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 541-549, Jul-Sep 2010.

BABABUNMI, E.; OLORUNSOGO, O.; BASSIR, O. Toxicology of glyphosate in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978, ACADEMIC PRESS INC JNL-COMP SUBSCRIPTIONS 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495. p.319-320.

BAIRD, J.; DAVIES, B.; HINDS, P. S.; BAGGOTT, C.; REHM, R. S. What Impact Do Hospital and Unit-Based Rules Have Upon Patient and Family-Centered Care in the Pediatric Intensive Care Unit? **Journal of pediatric nursing**, 2014.

BAKER, N.; EAST, T.; LONG, S. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays* II. Photochemical function of thylakoids in vivo. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, n. 2, p. 189-197, 1983.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDWIN, I. T.; PRESTON, C. A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, n. 2, p. 137-145, 1999.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BATISH, D. R.; SETIA, N.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v. 23, n. 12, p. 1209-1214, 12// 2004.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R. K. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 61, n. 7-8, p. 465-471, 2006.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KOHLI, R. K.; KAUR, S.; YADAV, S. S. Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. **Agronomy for sustainable development**, v. 27, n. 3, p. 171-177, 2007.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H.; LONG, S.; BAKER, N.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, p. 497-514, 1989.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 10// 2001.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **Int J Food Microbiol**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUS, J. S.; CAGEN, S. Z.; OLGAARD, M.; GIBSON, J. E. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 35, n. 3, p. 501-513, 1976.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the Growth and Macronutrient Accumulation of Soybean. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2010.
- DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; DOS SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- DE SOUZA, T. A.; DE RDA MATTA, M.; MONTAGNER, E.; DE ABREU, A. B. G. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química nova**, v. 29, n. 6, p. 1372, 2006.
- DÍAZ-TIELAS, C.; GRANA, E.; SOTELO, T.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 8, p. 1500-1517, 2012.
- DO CARMO ARAÚJO, S. A.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.
- DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079-1089, 1999.
- EMBRAPA. **Sistemas de Produção -Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. 2012. 261 ISBN 2176-2902.

- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, 2004. 323 ISBN 8536303832.
- FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2690-2694, 1997/07/01 1997.
- GELMINI, G. A.; FILHO, R. V.; NOVO, M. D. D. S.; ADORYAN, M. L. Resistence of Euphorbia heterophylla L. to ALS-inhibiting herbicides in soybean. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 452-457, Sep-Oct 2005.
- GELMINI, G. A.; VICTÓRIA FILHO, R.; SOARES NOVO, M.; ADORYAN, M. L. Resistência de biótipos de Euphorbia heterophylla L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, v. 60, n. 2, p. 93-99, 2001.
- GENTY, B.; HARBINSON, J.; BAKER, N. R. Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. . **Plant Physiol Biochem**, v. 28, p. 1-10, 1989.
- GFELLER, R. W.; MESSONNIER, S. P. **Handbook of small animal toxicology and poisonings**. Mosby St. Louis, 2004. ISBN 0323012469.
- GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L.; PIMENTEL, N. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 01, p. 23-28, 2009.
- GRANA, E.; DÁAZ-TIELAS, C.; M SANCHEZ-MOREIRAS, A.; J REIGOSA, M. Mode of Action of Monoterpenes in Plant-Plant Interactions. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, p. 80-89, 2012.
- GRISOLIA, C. K.; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 59, n. 1, p. 123-126, 2004.
- GUSMAN, A. B.; MUCILLO, G.; PIRES, M. H. Efeito do citronelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (Euphorbia heterophylla L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 20-24, 1990.
- GUSMAN, A. B.; PITELLI, R. A.; DIAS, S. M. Efeito do citronelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (Euphorbia Heterophylla L) II. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 14-22, 1994.
- HE, H.; WANG, H.; FANG, C.; LIN, Y.; ZENG, C.; WU, L.; GUO, W.; LIN, W. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on Echinochloa crus-galli. **Weed research**, v. 49, n. 2, p. 183-192, 2009.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 45, n. 3, p. 115-120, 1970.

- HUANG, C.-N.; CORNEJO, M.; BUSH, D.; JONES, R. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, n. 2-3, p. 80-87, 1986.
- HUANG, J.; CARDOZA, Y. J.; SCHMELZ, E. A.; RAINA, R.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 767-775, 2003.
- INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 325-331, 2004.
- JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verlag Hamburg, 1998. ISBN 3930826488.
- KAUR, S.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. *Artemisia scoparia* essential oil inhibited root growth involves reactive oxygen species (ROS)-mediated disruption of oxidative metabolism: In vivo ROS detection and alterations in antioxidant enzymes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 390-399, 2012.
- KERN, K. A.; PERGO, E. M.; KAGAMI, F. L.; ARRAES, L. S.; SERT, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11-12, p. 1095-1101, 11// 2009.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Eucalypt oils for the control of *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus* L.). **Crop Protection**, v. 17, n. 2, p. 119-122, 3// 1998.
- KRAUSE, G.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 313-349, 1991.
- LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.
- LAMBERT, R.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LAPCZYNSKI, A.; BHATIA, S. P.; FOXENBERG, R. J.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, Supplement, p. S160-S170, 2008.
- LARKIN, P. Purification and viability determinations of plant protoplasts. **Planta**, v. 128, n. 3, p. 213-216, 1976.
- LERDAU, M.; GRAY, D. Ecology and evolution of light-dependent and light-independent phytogetic volatile organic carbon. **New Phytologist**, v. 157, n. 2, p. 199-211, 2003.

LORBER, P.; MULLER, W. H. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany**, p. 196-200, 1976.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6. Nova Odessa: Editora Plantarum Ltda, 2006. 339 ISBN 85-86714-22-4.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. **Nova Odessa: Editora Plantarum Ltda 299p.-col. illus.. Por Icones. Geog**, v. 6, p. 339, 2006.

LUIZA ISHII-IWAMOTO, E.; MARUSA PERGO COELHO, E.; REIS, B.; SEBASTIAO MOSCHETA, I.; MOACIR BONATO, C. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, p. 50-64, 2012.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B. D.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. D. S.; AMÓRA, S. D. S. A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 223-227, 2011.

MARTINS, R. Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. **Rev Bras Pl Med Botucatu**, v. 8, n. 2, p. 71-78, 2006.

MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MESQUITA, H. C. D.; RODRIGUES, A. P.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F. D. RISCOS TOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA GLYPHOSATE. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIARIDO**, v. 7, n. 2, p. 01-05, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Regra para análise de sementes**. 2009. 395.

MOORE, A.; DONAHUE, C. J.; BAUER, K. D.; MATHER, J. P. Chapter 15 Simultaneous Measurement of Cell Cycle and Apoptotic Cell Death. In: JENNIE, P. M. e DAVID, B. (Ed.). **Methods in Cell Biology**: Academic Press, v. Volume 57, 1998. p.265-278. ISBN 0091-679X.

MORIANA, A.; VILLALOBOS, F.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 3, p. 395-405, 2002.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.



- NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187-1203, 2005.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010/07/14 2010.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest management science**, v. 67, n. 3, p. 341-351, 2011.
- ÖGREN, E.; ÖQUIST, G. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. **Planta**, v. 166, n. 3, p. 380-388, 1985.
- OSWEILER, G. D. **Toxicologia veterinária**. Artes Médicas, 1998. ISBN 8573073373.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325-332, 1999.
- PERGO, É. M.; ABRAHIM, D.; DA SILVA, P. C. S.; KERN, K. A.; DA SILVA, L. J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E. L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 4, p. 499-507, 2008.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.
- POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Manag Sci**, v. 64, n. 4, p. 360-5, Apr 2008.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M. N.; BONJARDIM, L. R.; SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 619-624, 8/1/ 2008.
- RAI, V.; GUPTA, S.; SINGH, B. Volatile monoterpenes from *Prinsepia utilis* L. leaves inhibit stomatal opening in *Vicia faba* L. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 1, p. 121-124, 2003.
- RAJESWARA RAO, B. R.; KAUL, P. N.; SYAMASUNDAR, K. V.; RAMESH, S. Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 3, p. 243-246, 9// 2002.
- REIGOSA, R.; JOAQUÍN, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. S. **Allelopathy : a physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006. xiv, 637 p. ISBN 1402042795 (HB)

9781402042799 (HB). Disponível em: <  
<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0824/2007468801-d.html>  
<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0824/2007468801-t.html>>.

REIS, B. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L. Merrill, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L. 2011. 42 (mestrado). Programa de pós graduação em agronomia, Universidade Estadual de Maringá, [http://www.pga.uem.br/uploads/teses\\_253\\_0b7R3HAf4fMEbEjkW7oN9SbWp.pdf](http://www.pga.uem.br/uploads/teses_253_0b7R3HAf4fMEbEjkW7oN9SbWp.pdf).

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 3, p. 167-173, 2003.

ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 1, p. 303-313, 2000.

ROSADO, L.; RODRIGUES, H.; PINTO, J.; CUSTÓDIO, T.; PINTO, L.; BERTOLUCCI, S. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço “Maria Bonita” na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 422-428, 2009.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 55, n. 1, p. 134, 1966.

SALAMCI, E.; KORDALI, S.; KOTAN, R.; ÇAKIR, A.; KAYA, Y. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 9, p. 569-581, 9// 2007.

SANTOS, R. B. D.; JÚNIOR, V. L.; DE, E. V. R.; CASTRO; BALTHAR, V. D. O.; GRECO, S. J. Uso de métodos quimiométricos e mecânicoquânticos na análise de terpenóides e fenilpropanóides bioativos contra o *Aedes aegypti*. **Orbital**, v. 1, n. 4, p. 273-288, 2009.

SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 295-306, 2003.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. In: SCHULZE, E.-D. e CALDWELL, M. (Ed.). **Ecophysiology of Photosynthesis**: Springer Berlin Heidelberg, v.100, 1995. cap. 3, p.49-70. (Springer Study Edition). ISBN 978-3-540-58571-8.

SENADO, A. Brasileiro ingere 5 kg de agrotóxicos por ano. 2012. Disponível em: <  
<http://www12.senado.gov.br/noticias/materias/2012/11/08/brasileiro-ingere-5kg-de-agrotoxicos-por-ano>>.

- SÉRALINI, G. E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; DE VENDÔMOIS, J. S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, 2012.
- SETIA, N.; BATISH, D.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 63-67, 2007.
- SINGH, H.; BATISH, D.; SETIA, N.; KOHLI, R. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of applied biology**, v. 146, n. 1, p. 89-94, 2005.
- SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K.  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2006.
- SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R. K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 2, p. 111-116, 2002.
- SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 347-350, 5// 2002.
- STEENHUISEN, S. L.; RAGUSO, R. A.; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, Sep 20 2012.
- STIGGER, A. L.; BARROS, C. S.; LANGOHR, I. M.; BARROS, S. S. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg (Leg. P. Papilionoideae) em ovinos apilionoideae) em ovinos11. **Pesq. Vet. Bras**, v. 21, n. 3, p. 98-108, 2001.
- SVENSSON, G. P.; PELLMYR, O.; RAGUSO, R. A. Pollinator attraction to volatiles from virgin and pollinated host flowers in a yucca/moth obligate mutualism. **Oikos**, v. 120, n. 10, p. 1577-1583, Oct 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5th Ed. 2012. 782.
- THEIS, N.; RAGUSO, R. A. The effect of pollination on floral fragrance in thistles. **J Chem Ecol**, v. 31, n. 11, p. 2581-600, Nov 2005.
- TREZZI, M. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, n. 5, p. 1075-1082, 2009.
- UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2009.

USFUMIGATION.ORG. 2015. Disponível em: <  
[http://www.usfumigation.org/Chemical\\_Herbicides/Glyphosate](http://www.usfumigation.org/Chemical_Herbicides/Glyphosate)>. Acesso em: 10/01/2015.

VALOTTO, C. F. B.; SILVA, H. H. G. D.; CAVASIN, G.; GERIS, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SILVA, I. G. D. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Rev Soc Bras de Med Trop**, v. 44, p. 194-200, 2011.

VICKERS, C. E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M. T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 5, p. 283-291, May 2009.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: II – Distribuição geográfica e caracterização genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **Agrociência**, v. 10, p. 461-465, 2004 2004.

WEISS, O.; REIGOSA, R. M. J. R. Modulated fluorescence. In: (Ed.). **Handbook of plant ecophysiology techniques**: Springer, 2001. p.173-183. ISBN 0792370538.

WIDHOLM, J. M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 47, n. 4, p. 189-194, 1972.

WILEY-REGISTRY. **8th Edition with NIST 05 MS Spectra, Revision 2005 D.06.00, Agilent Technologies**. 2007.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

ZANARDO, D. I. L.; LIMA, R. B.; FERRARESE, M. D. L. L.; BUBNA, G. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 25-30, 4// 2009.