

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

FLAVIA CAROLINA MOREIRA-VILAR

EFEITOS DO ÁCIDO *p*-METOXICINÂMICO EM RAÍZES DE *Euphorbia*
heterophylla

Maringá

2016

FLAVIA CAROLINA MOREIRA-VILAR

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico em raízes de *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 a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

Maringá

2016

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

M838e Moreira-Vilar, Flavia Carolina
 Efeitos do ácido p-metoxicinâmico em raízes de
Euphorbia heterophylla / Flavia Carolina Moreira
Vilar. -- Maringá, 2016.
 89 f. : il. col., figs., tabs.

 Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.
 Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2016

 1. *Euphorbia heterophylla* - Alelopatia - Manejo
de plantas daninhas. 2. *Euphorbia heterophylla* -
Lignina. 3. *Euphorbia heterophylla* - Viabilidade
celular. 4. *Euphorbia heterophylla* - Índice
mitótico. 5. *Euphorbia heterophylla* - Aminoácidos.
6. *Euphorbia heterophylla* - Respiração. I.
Ferrarese-Filho, Osvaldo, orient. II. Marchiosi,
Rogério, 1983-, co-orient. III. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 633.2

MN-003871

FOLHA DE APROVAÇÃO

FLAVIA CAROLINA MOREIRA VILAR

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico em raízes de *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 pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Graciene Souza Bido
Centro Universitário UNICESUMAR

Prof. Dr. Paulo Alfredo Feitoza Bohm
Universidade Estadual do Paraná

Prof. Dr. Rogério Marchiosi
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
Universidade Estadual de Maringá

Local de defesa: Sala nº 16, Bloco J 45 (térreo), *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Airton e Natalina Moreira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta existência, pela proteção e amparo nos momentos de esgotamento.

À minha família, meus pais Airton e Natalina, pelo amor, educação e incentivo.

Aos meus irmãos Felipe e Cássio, amor fraternal onde aprendo sempre.

Ao meu filho Pedro, por me ensinar o que é o amor incondicional.

Ao meu esposo César, companheiro de todas as horas, obrigada pelo carinho e apoio.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA), pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho, pela orientação e confiança durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Marchiosi, pela co-orientação, incentivo e conhecimentos transmitidos.

À Dr^a Rita de Cássia Siqueira-Soares, que não mediu esforços para que esta pesquisa fosse realizada. Obrigada minha querida amiga.

Ao meu primeiro orientador de graduação, Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato, que despertou em mim a vontade de seguir a carreira científica.

Aos meus amigos do Bioplan, em especial a Aparecida Maria Dantas Ramos, pela amizade, convivência, apoio e auxílio dispensados.

Aos funcionários da secretaria do PGA, em especial a Érika Sato, pela amizade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico em raízes de *Euphorbia heterophylla*

RESUMO

Compostos naturais com ação alelopática podem servir de base para o desenvolvimento de produtos que venham a auxiliar no manejo de culturas agrícolas, principalmente no tocante às plantas daninhas. Neste sentido, o objetivo dos trabalhos apresentados a seguir foi avaliar os efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) em raízes de *Euphorbia heterophylla* na fase juvenil. Os resultados indicaram que o AMC apresentou efeito alelopático, reduzindo significativamente a taxa de crescimento das raízes em baixas concentrações, atingindo inibição de 50% e 80% com 47,67 e 190 µM, respectivamente. Foi possível observar também uma gradual redução da divisão celular com o aumento da concentração, assim como a perda da viabilidade celular nos ápices das raízes crescidas na presença do AMC. No entanto, a quantidade de aminoácidos totais foi incrementada com o acréscimo da concentração do AMC. Houve incremento do teor de ácido ferúlico, cumárico e incorporação do AMC na parede celular. A ativação da peroxidase ligada a parede pode sugerir sua participação na esterificação destes compostos na parede. A concentração dos monômeros não foi afetada e apenas a I80 aumentou a atividade da PAL e o teor de lignina. AMC promoveu um incremento da respiração extramitocondrial, favoreceu o acúmulo de peróxido de hidrogênio e ativou enzimas do metabolismo antioxidativo. A relação ATP/ADP foi significativamente reduzida em todos os tratamentos testados.

Palavras-chave: Alelopatia. Planta daninha. Viabilidade celular. Índice mitótico. Aminoácidos. Lignina. Respiração.

Effects of *p*-methoxycinnamic acid on *Euphorbia heterophylla* roots

ABSTRACT

Natural compounds with allelopathic action can serve as a basis for the development of products that will assist in crops management, particularly regard to weeds. Therefore, the aim of this work present below was to evaluate the effects of *p*-methoxycinnamic acid (MCA) on *Euphorbia heterophylla* roots in the young stage. The results indicate that allelopathic effect of MCA has significantly reduced growth rate on roots at low concentrations, reaching 50% inhibition with 47.67 μ M and 190 μ M to 80% inhibition. It was also possible to observe a gradual reduction of cell division with increasing concentration as well a loss of cell viability on the roots apices exposed to MCA. However, the amount of amino acids was increased with acid concentration addition. There was an increase of ferulic acid, cumaric acid and incorporation of MCA on the cell wall. The activation of cell wall peroxidase suggest its participation on esterification process of this components. The monomers concentration was not affect and only I80increase PAL activity and lignin content. Root apex respiratory was also affected by MCA. The allelochemical increased the extramitochondrial respiration, induced the hydrogen peroxide accumulation and activated enzymes of antioxidative metabolism. ATP/ADP rate was reduced in all treatment tested.

Keywords: Allelopathy. Weed. Cell viability. Mitotic index. Amino acids. Lignin. Respiration.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
Alelopatia histórico e definições.....	3
Alelopatia na agricultura.....	5
Mecanismo de ação dos aleloquímicos.....	7
Aleloquímicos como fonte para novos herbicidas	10
Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC).....	12
<i>Euphorbia heterophylla</i>	13
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 1. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico sobre o crescimento radicular e viabilidade celular de plantas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2.1 Material e condução experimental	28
2.2 Obtenção das plantas	28
2.3 Sistema experimental, cultivo e tratamento das plantas	28
2.4 Variáveis biométricas	29
2.5 Consumo de solução nutritiva.....	29
2.6 Teor relativo de água das raízes.....	29
2.7 Índice mitótico	30
2.8 Quantificação de aminoácidos	30
2.8.1 Extração genérica	30
2.8.2 Derivatização e quantificação de aminoácidos livres	31
2.9 Viabilidade celular.....	32
2.9.1 Viabilidade celular por método quantitativo.....	32
2.9.2 Viabilidade celular por método qualitativo.....	32
2.10 Delineamento experimental e estatística.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 2. Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico na lignificação de raízes de plântulas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO.....	50

2.1 Cultivo e tratamento das plantas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	53
2.2 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).....	53
2.3 Determinação do teor e da composição monomérica da lignina	54
2.3.1 Obtenção da parede celular	54
2.3.2 Determinação do teor de lignina	54
2.3.3 Determinação da composição monomérica da lignina.....	55
2.4 Determinação da atividade da peroxidase ligada à parede celular (EC 1.11. 1.7)	55
2.5 Determinação do teor de proteína total.....	56
2.6 Determinação dos ácidos <i>p</i> -metoxicinâmico, <i>p</i> -cumárico e ferúlico ligados à parede celular.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÕES	65
5. REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 3. Respiração e atividade de enzimas antioxidantes em raízes de <i>Euphorbia heterophylla</i> na presença do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico	70
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1 Cultivo e tratamento das plantas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	75
2.2 Avaliação do consumo de oxigênio dos ápices radiculares	75
2.3 Atividade da peroxidase solúvel (EC 1.11.1.7)	76
2.4 Extração genérica para determinação da atividade da superóxido dismutase e catalase.....	76
2.5 Atividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)	76
2.6 Atividade da catalase (EC 1.11.1.6).....	77
2.7 Determinação de proteínas.....	77
2.8 Determinação da concentração de H ₂ O ₂	77
2.9 Determinação da relação ATP/ADP	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4. CONCLUSÃO.....	86
5. REFERÊNCIAS	87

INTRODUÇÃO GERAL

A alelopatia é a interferência de um organismo sobre o crescimento, sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de um outro organismo vizinho, por meio da liberação de compostos químicos no ambiente. Este fenômeno ocorre naturalmente em nível intra- e interespecífico nas comunidades de plantas, algas, bactérias e fungos que utilizam dos compostos químicos, denominados aleloquímicos, para a conquista de espaço, autodefesa e garantia de perpetuação da espécie.

Aleloquímicos são substâncias não nutritivas produzidas pelo metabolismo secundário vegetal e estão divididas em três grandes grupos: terpenoides, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Estas substâncias podem ser liberadas no ambiente por volatilização por meio das partes aéreas da planta, lixiviação das partes aéreas pela chuva e orvalho, exsudação pelas raízes, lixiviação proveniente dos restos vegetais ou decomposição da matéria orgânica.

Um dos grandes atrativos da alelopatia é a possível aplicabilidade no manejo das plantas daninhas, tendo em vista o aumento dos custos dos produtos químicos, o risco de toxicidade ao homem e aos organismos não alvo, a degradação do meio ambiente, a presença de resíduos em alimentos e o aumento de casos de resistência, todos estes associados ao uso sistemático e contínuo de herbicidas. Porém, o interesse nesta área pode ser atribuído a dois principais motivos: como base para a produção de novos produtos e no desenvolvimento de cultivares geneticamente modificados. Neste, as plantas podem expressar em maior quantidade determinado aleloquímico que pode ser liberado durante a fase vegetativa ou mesmo após a morte do vegetal e, desta forma, contribuir para o controle das plantas invasoras.

A fitotoxicidade das substâncias aleloquímicas pode afetar vários processos fisiológicos e bioquímicos, entre eles a germinação de sementes e gemas, a divisão celular, a respiração, a fotossíntese, a permeabilidade de membranas, o balanço no sistema antioxidante, alteração na atividade de várias enzimas, entre outros. A importância de cada um deles irá depender do composto, da concentração e da espécie receptora. Apesar dos avanços no estudo da alelopatia, o entendimento dos mecanismos e modo de ação utilizados pelos aleloquímicos para interferir no crescimento e desenvolvimento de outra planta ainda são de difícil compreensão. O grande entrave é que compostos alelopáticos muitas vezes afetam mais de uma função e provocam efeitos colaterais difíceis de distinguir dos principais. O que para a pesquisa é um

desafio contínuo, para as plantas é uma estratégia que garante a interferência, pois agindo em mais de um alvo molecular, a eficácia da ação alelopática em organismos suscetíveis tende a ser melhor sucedida.

A abundância química das espécies vegetais faz com que novas moléculas sejam constantemente identificadas, isoladas e analisadas como potenciais aleloquímicos. Dentre estas, derivados do ácido cinâmico representam uma importante e numerosa classe de químicos, que tem atraído um grande número de estudos nas áreas biológicas e agronômicas. O ácido *p*-metoxicinâmico pertence a este grupo de compostos. No entanto, são escassos os trabalhos que confirmam seu potencial alelopático, principalmente, seus efeitos em uma planta daninha. Neste contexto, será abordado, neste trabalho, um conjunto de estudos que tem por objetivo avaliar o potencial alelopático do ácido *p*-metoxicinâmico nas raízes de *Euphorbia heterophylla*, na fase inicial de crescimento e desenvolvimento, em um sistema hidropônico.

REVISÃO DE LITERATURA

Alelopatia histórico e definições

O termo alelopatia vem da união das palavras gregas “alléllon” e “pathos” que significam *de um para o outro* e *sofrer*, respectivamente. O fisiologista vegetal Hans Molish foi o primeiro a pesquisar e designar este termo baseado em suas observações do fenômeno de interinfluência entre plantas e micro-organismos, sem a necessidade de contato físico (TANG et al., 1995). A partir daí, o interesse em investigar a ocorrência deste evento ganhou ampla repercussão e a definição de alelopatia ainda vem sendo discutida. Rice (1984) sugere que alelopatia é qualquer efeito direto ou indireto, benéfico ou não, de uma planta ou de micro-organismos sobre outra planta, mediante liberação de compostos químicos no ambiente. Tal caracterização é uma das mais aceitas atualmente, embora a Sociedade Internacional de Alelopatia em 1996 definiu como a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (PINTO et al., 2002).

Os primeiros relatos de interferência de uma planta sobre o desenvolvimento de outra se deu por volta de 300 a.C. pelo discípulo de Aristóteles, Theophrastus, e mais tarde pelo naturalista romano Plínio, que observou que sob as árvores de noqueira-preta não cresciam outros vegetais. Apesar do pouco conhecimento sobre alelopatia na época, Plínio afirmou que “a natureza de algumas plantas, embora não levasse outras plantas à morte, era prejudicial devido às misturas de odores ou extratos” (WESTON, 2005). Hoje se sabe que a fitotoxina produzida pela noqueira é a juglona, um desacoplador da fosforilação oxidativa (SALING et al., 2011).

O potencial alelopático de certas plantas tem sido considerado uma ferramenta importante no manejo de agroecossistemas para uma agricultura sustentável, uma vez que pode reduzir a poluição ambiental gerada pelo uso intensificado e contínuo de agrotóxicos e até mesmo aumentar a produção de grãos, frutas e madeira (INDERJIT et al., 2011).

Para entender melhor o fenômeno da alelopatia, é preciso diferenciá-lo da simples competição entre plantas. Competição e alelopatia são formas de interferência, mas na primeira a planta com potencial alelopático libera um princípio tóxico no meio,

enquanto que na competição entre plantas um ou mais fatores necessários para o crescimento destas (água, nutrientes e outros) são retirados do ambiente (FRIEDMAM & WALLER, 1985).

Efeitos alelopáticos pouco intensos no estágio de plântula podem ser superestimados ou revertidos pelo efeito competitivo (WEIDENHAMER et al., 1996). Contudo, para determinada quantidade de substância alelopática, o aumento da densidade de plantas-alvo diminui o efeito alelopático, embora aumente a interferência por competição (WEIDENHAMER et al., 1989). Outro evento comum observado na ciência da alelopatia é que um composto alelopático pode também ser tóxico para o próprio indivíduo sintetizador ou para indivíduos da mesma espécie. A esse efeito autoinibitório dá-se o nome de autotoxicidade ou ainda autoalelopatia. Na agricultura, são importantes os relatos de ocorrência de autoalelopatia em áreas de cultivo de cenoura, cana-de-açúcar, trigo e pepino (JASICKA-MISIAK et al., 2005; SAMPIETRO, 2006; YE et al., 2006).

Os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um dado composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no meio ambiente (RICE, 1984). Como é o caso do extrato volátil de óleo de jaborandi, que apresentou efeito alelopático benéfico, estimulando o crescimento de radículas de *Lettuca sativa* (ALVES et al., 2004).

Os compostos químicos liberados pelas plantas ou micro-organismos no ambiente e que estabelecem influências benéficas ou deletérias sobre outras plantas ou micro-organismos são denominados aleloquímicos ou substâncias alelopáticas (INDERJIT & KEATING, 1999). Tais substâncias podem afetar o crescimento, prejudicar o desenvolvimento normal e até mesmo inibir a germinação de sementes de outras espécies. Neste caso, quando o composto liberado causa somente efeitos prejudiciais, recebe também o nome de fitotoxina. O local de síntese dos compostos alelopáticos ocorre tanto na parte aérea quanto na parte radicular das plantas, sua concentração varia de espécie para espécie, e ainda numa mesma espécie, de acordo com a parte da planta e seu estágio de desenvolvimento (INDERJIT & KEATING, 1999).

Com raras exceções, os aleloquímicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas, em geral, das vias metabólicas do acetato e do ácido chiquímico, ou ainda, de esqueletos químicos provenientes da combinação dessas duas vias (EINHELLIG,

1995). São conhecidos pelo menos dez mil compostos secundários com ação alelopática e, após diversas tentativas de agrupamento, TAIZ & ZEIGER (2009) adotaram uma divisão destas substâncias em três grandes grupos levando em conta sua rota biossintética. São eles: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados. Os compostos fenólicos e os terpenos representam os principais compostos com características alelopáticas. Os primeiros constituem um grupo formado por ácidos fenólicos, flavonoides e cumarinas. Os terpenos, por sua vez, constituem um grupo formado pelo monoterpenos, di e triterpenos, sesquiterpenos e politerpenos.

Alelopátia na agricultura

Um dos principais objetivos da pesquisa sobre alelopátia inclui sua aplicação nos sistemas de produção agrícola, possibilitando a redução do uso indiscriminado de defensivos químicos. Neste contexto, o manejo de plantas daninhas assume fundamental importância, uma vez que pode causar grandes prejuízos à produção agrícola. Somado a isto, os herbicidas representam mais da metade de todo o volume de defensivos agrícolas aplicados no mundo, que gerou a crescente preocupação da população com o potencial nocivo a saúde humana e ao meio ambiente associado ao uso deles.

A alelopátia pode desempenhar um papel benéfico em vários sistemas de cultivos como a policultura, uso de culturas de coberturas, rotação de culturas, cultivo mínimo e plantio direto. O cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.), em rotação com aveia durante cinco safras, causou menor incremento na densidade de plantas daninhas nas parcelas onde o sistema de rotação foi adotado (LEATHER, 1987). Lactonas sesquiterpênicas com germacranolide e esqueletos guaianolide e heliannuol liberados pela decomposição do girassol seriam responsáveis pela atividade alelopática (MACIAS et al., 2000).

Resíduos vegetais provenientes de culturas podem fornecer controle de plantas daninhas através da resistência física que impõem, bem como agir de forma a barrar a captação de luz pelas espécies daninhas, impedindo a emergência destas plantas, ou ainda limitar ou suprimir a germinação e crescimento pela liberação de aleloquímicos (INDERJIT & KEATING, 1999). Culturas, como centeio (*Secale cereale* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench.), mostarda preta (*Brassica nigra* L. Koch), híbridos de sorgo (*Sorghum* sp.), mucuna (*Mucuna pruriens*), girassol (*Helianthus annuus*), bem como as várias espécies de braquiária,

atuam desta forma quando utilizadas nos sistemas de rotação e tem, portanto, potencial de uso no manejo de plantas daninhas (WESTON, 1996; SOUZA FILHO et al., 1997).

Culturas de cobertura também podem oferecer muitos benefícios tanto para a produção orgânica quanto para a convencional. Como por exemplo, *Vici* spp. e outras espécies da família Fabaceae fixam nitrogênio e liberam alguns aleloquímicos que podem inibir a emergência de plantas daninhas. Tokura & Nóbrega (2006) avaliaram o potencial alelopático de cultivos de cobertura vegetal de trigo, aveia preta, milheto, nabo forrageiro e colza sobre o desenvolvimento de plantas infestantes. Os autores observaram que as coberturas vegetais de aveia preta e milheto apresentaram maior controle sobre as plantas infestantes nas parcelas. Em relação à aveia, estudos de diferentes pesquisadores sugerem que a exsudação de escopoletina pelas raízes destas plantas poderia ser responsável pelo possível efeito alelopático da cultura. No entanto, além deste composto, cumarina, ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido vanílico também estão presentes em exsudatos de espécies do gênero avena (PEREZ & NUNES, 1991), sugerindo que os efeitos possam ser oriundos de outros compostos ou da interação entre eles. Os genes atrelados a produção dos compostos alelopáticos da aveia podem ser identificados geneticamente para que, futuramente, cultivares com elevado potencial alelopático possam ajudar no controle de plantas daninhas num futuro próximo.

O efeito alelopático também pode acontecer quando ocorre o uso consorciado de plantas que liberam aleloquímicos. Por exemplo, o consórcio de milho com *Urochloa* spp (*Brachiaria* spp) aumenta o rendimento da cultura e o volume de palhada - restos culturais, melhora a qualidade do solo, além de reduzir a infestação por plantas daninhas (BORGES et al., 2015). Severino et al. (2006) também avaliaram *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* em sistema de integração com a cultura do milho, no que diz respeito aos efeitos destas plantas sobre a infestação de algumas plantas daninhas. Os resultados mostraram que *B. brizantha* foi a forrageira mais eficiente em reduzir a infestação de *Ipomoea grandifolia*. *P. maximum* foi a espécie que mais reduziu o crescimento de *Amaranthus hybridus* e a área foliar de *Digitaria horizontalis*.

A utilização de plantas com potencial alelopático pode não ser tão eficiente na contenção de espécies de plantas daninhas se adotadas como única estratégia de manejo (TREZZI et al., 2016). Assim, esta prática deve ser somada a outras formas de controle como o físico, o cultural e o químico, para que, desta forma, a quantidade de plantas

infestantes não ultrapasse o limite máximo que venha causar prejuízos à produção da cultura.

Mecanismo de ação dos aleloquímicos

Os mecanismos de ação pelos quais os aleloquímicos utilizam para interferir no crescimento e desenvolvimento de outra planta, envolve vários processos fisiológicos e bioquímicos. No entanto, distinguir entre os efeitos primários e secundários, não é uma tarefa fácil, pois um mesmo aleloquímico pode afetar mais de um processo celular não relacionado. A seguir, será apresentado alguns dos mecanismos de ação dos aleloquímicos

- **Inibição da divisão celular**

A ação de alguns aleloquímicos, assim como alguns herbicidas inibidores do crescimento inicial, envolve alguns componentes do processo mitótico. Os monoterpenoides cânfora, 1,8-cineole, β -pineno, α -pineno e canfeno reduzem o índice mitótico e a síntese de DNA em meristemas radiculares de *Brassica campestris*. Porém, estes efeitos não foram observados no ápice caulinar, indicando seletividade morfológica (NISHIDA et al., 2005). O 2(3H)-benzoxazolinone (BOA) inibe o processo mitótico, especificamente a fase G2-M em alface (SANCHES-MORAIS et al, 2008) e sorgoleona reduz o número de células em divisão de cada fase da mitose, danificando ainda as tubulinas, que resulta na formação de núcleos poliploides (HALLAK et al., 1999).

- **Influência na respiração**

Ishii-Iwamoto et al. (2012) sugerem que o metabolismo mitocondrial pode ser o principal modo de ação dos aleloquímicos monoterpenoides, podendo agir em fases distintas do ciclo respiratório. A maioria das atividades celulares básicas, como o transporte de íons e solutos pela membrana, a síntese de lipídeos, clorofila, proteínas, ácidos nucleicos e a divisão celular, requer uma fonte de energia. Perturbações na síntese de ATP podem prejudicar, severamente, muitos destes processos fisiológicos. Em estudos realizados com mitocôndrias isoladas, os aleloquímicos α -pineno, limoneno, 1,8-cineole e cânfora, tanto em plantas de soja quanto de milho, foi verificado a ativação do estado IV da respiração e a diminuição do coeficiente respiratório, sugerindo que aqueles compostos possuem uma ação em comum, como desacopladores da fosforilação oxidativa

(ABRAHIM et al., 2003a; ABRAHIM et al., 2003b). Tais efeitos observados em mitocôndrias isoladas podem, também, se manifestar nas organelas de tecidos intactos (ISHII-IWAMOTO et al., 2006). Reis (2011) avaliou o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowit na atividade respiratória de *Euphorbia heterophylla*. No ápice radicular intacto, a atividade respiratória total foi inibida de forma dose-dependente e, por não apresentar respiração KCN-insensível, possivelmente os componentes ativos do óleo essencial, reduziu o fluxo de elétrons via citocromo oxidase. Esta interpretação foi corroborada pelo efeito direto na mitocôndria isolada. Os autores verificaram que ocorreu uma forte redução do consumo de O₂ durante a fosforilação do ADP (estado III) sem afetar significativamente o estado IV da respiração.

- Desequilíbrio no sistema antioxidante

A geração e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o balanço do estado redox celular possuem um papel importante no que se refere aos efeitos alelopáticos. Segundo Weir et al. (2004), a produção de EROs representa um dos principais mecanismos de ação das fitotoxinas. Após a exposição aos aleloquímicos, as plantas receptoras produzem rapidamente EROs próximo a área de contato (BAIS et al., 2003; DING et al., 2007) e altera a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD; YU et al., 2003) e peroxidase-ácido ascórbico (APX; ZUO et al., 2012) numa tentativa de resistir ao estresse oxidativo. Batish et al. (2008) verificaram que o ácido cafeico induz significativas mudanças na atividade de proteases, PODs, e polifenóis oxidases (PPOs) durante o desenvolvimento radicular e diminui o conteúdo total de fenólicos endógenos no hipocótilo de feijão-mungo (*Phaseolus aureus*). Chuah et al. (2015) avaliaram o efeito do 2,4-ditert-butylphenol em duas espécies de planta daninha, a monocotiledônea *Leptochloa chinensis* (L.) e a dicotiledônea *Hedyotis verticillata* (L.). Os autores observaram aumento na atividade da SOD, POD e catalase (CAT), tanto nas raízes quanto nas folhas das plantas tratadas, muitas vezes superior a 100% comparado ao controle.

- Inibição da fotossíntese

Os efeitos dos aleloquímicos na fotossíntese envolve, principalmente, a inibição ou o dano no maquinário sintético e na aceleração da decomposição dos pigmentos fotossintéticos. Conseqüentemente, as concentrações destes pigmentos diminuem, ocorre o bloqueio da transferência de elétrons, redução da

atividade da ATP sintase, da síntese de ATP, alterando a condutância estomática e a transpiração, inibindo o processo fotossintético (CHENG & CHENG, 2015). O aleloquímico pode afetar a fotossíntese alterando a função do fotossistema II (PSII) (WEIR et al., 2004). Por exemplo, sorgoleona inibe a evolução do O₂ ao se ligar ao sítio Q_B do PSII das plantas superiores (CZARNOTA et al., 2001). Além disso, sorgoleona também inibe a hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) (MAEZZA et al., 2002). A inibição da HPPD resulta em depleção dos níveis de plastoquinona, pois esta enzima faz parte da via biossintética deste composto. SHAO et al (2009) demonstraram que a proteína D1 do PSII é um importante alvo do pirogalol, alterando a fotossíntese em *Microcystis aeruginosa*. Alguns aleloquímicos são, ainda, inibidores da H⁺-ATPase do tipo F do cloroplasto, inibindo a fosforilação fotossintética de ADP. Entre eles estão a euparina e o piquerol (MÉNDOZA et al., 1994), geduína e derivados fenilcumarinas (LOTINA-HENNSEN et al., 2006) e os flavonoides quercitina e naringenina (MORELAND & NOVITZKY, 1987).

- Alteração na permeabilidade de membranas

Vários estudos têm demonstrado que muitos aleloquímicos podem inibir a atividade de enzimas antioxidantes e aumentar o conteúdo de radicais livres, resultando em aumentos na peroxidação lipídica e da permeabilidade da membrana (LIN, 2010; HARUN et al., 2014). Zuo et al. (2012) relatam que o efeito alelopático do extrato de trigo combinado com o extrato da planta daninha *Alopecurus aequalis* acumula EROs como o O₂ e H₂O₂, além de incrementar os teores de malondialdeído (MDA) em folhas de batata transgênica e não transgênica. Além disso, foi observado aumento da permeabilidade da membrana e alteração das atividades da SOD e APX. Poonpaiboonpipat et al. (2013) encontraram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* danifica a membrana celular de *Echinochloa crus-galli* L. por causar a peroxidação lipídica e aumentar a condutividade elétrica, indicando extravasamento de eletrólitos. As ações dos aleloquímicos sobre as propriedades de membrana desencadeando alterações no processo de lignificação e nas atividades de enzimas a ela relacionadas têm sido descritos. Ácidos fenólicos reagem diretamente com grupos sulfidríla que são fundamentais para a atividade das APTases. Eles induzem a atividade de enzimas oxidativas como as peroxidases, bem como aumentam a produção de radicais livres, elevando a peroxidação lipídica e

afetando a permeabilidade da membrana celular (BARZIMAKENGA et al., 1997). Simultaneamente, a síntese de lignina na parede celular é ativada. A lignificação está putativamente associada ao aumento da permeabilidade. Tais efeitos associados contribuem para a redução do crescimento das raízes e, por conseguinte, da planta (SANTOS et al., 2004).

Aleloquímicos como fonte para novos herbicidas

A busca por herbicidas com um novo perfil ambiental e toxicológico mais seguro é crescente a cada ano. Tal procura é guiada por dois principais motivos: a possível periculosidade à saúde humana e ambiental e a rápida evolução de plantas daninhas resistentes aos herbicidas e a classe de herbicidas atualmente disponíveis no mercado (DAYAN & DUKE, 2014). Produtos naturais, como os aleloquímicos, podem ter uma boa aceitação pela população, por apresentarem menores riscos comparados aos herbicidas sintéticos. Alguns exemplos de compostos potenciais que podem permitir a descoberta de novos herbicidas serão trados a seguir. Estes aleloquímicos são as momilactonas, os benzoxizinoídes e sorgoleona (Figura 1).

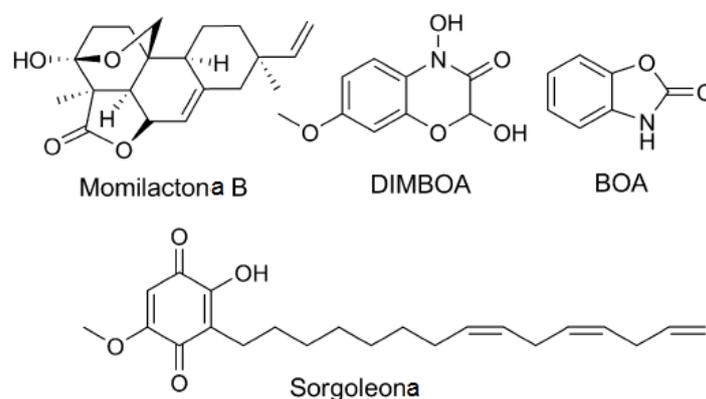


Figura 1. Estrutura química dos aleloquímicos potenciais como herbicidas (adaptado de DAYAN et al., 2009).

O 2(3H)-benzoxazolinona (BOA) é exudado pelas raízes de várias gramíneas cultivadas e exerce múltiplos efeitos fisiológicos nas plantas receptoras. A geração de EROs e o estresse oxidativo são eventos-chave no modo de ação deste composto (SCHULZ et al., 2013). BOA e 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) estão, geralmente, na forma de glucosídeos nas plantas produtoras. No entanto, estes glucosídeos estão sujeitos a degradação microbiana quando liberados no

solo, que, por sua vez, é transformada em agliconas (CAMBIER et al., 1999). Estas agliconas são instáveis e facilmente degradadas aos benzoxazolinonas correspondentes de curto tempo de meia-vida. Tais benzoxazolinonas podem ser novamente transformadas, tanto quimicamente quanto pela ação dos micróbios, em produtos de maior toxicidade (MACÍAS et al., 2004).

Sorgoleona é uma benzoquinona lipídica exudada pelas raízes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) que suprime o crescimento de um grande número de plantas daninhas monocotiledôneas e dicotiledôneas (NIMBAL et al, 1996). A inibição do crescimento foi observada em pré e pós emergência, tanto em casa de vegetação quanto em campo (UDDIN et al., 2010). As plantas de sorgo acumulam sorgoleona e seus análogos em pelos absorvente maduros das raízes, e a produção ótima ocorre em temperaturas que variam entre 25-35 °C. Este aleloquímico atua inibindo a fotossíntese, agindo no PSII e, também, na HPPD bloqueando a síntese de plastoquinona. Por apresentar alta lipofilicidade, sorgoleona é fortemente adsorvida pelos coloides do solo (TREZZI et al., 2006), além de possuir limitada translocação nas plantas alvo, que limitaria sua ação como herbicida (DAYAN et al., 2009). No entanto, Uddin et al. (2014) revelaram que esta substância, após formulação como pó molhável, torna-se efetiva no controle das plantas daninhas e seletiva as espécies cultivadas. Tal resposta oferece possibilidades da formulação de sorgoleona como herbicida menos agressivo ao meio ambiente e eficaz para o manejo de plantas daninhas.

As monilactonas A e B são aleloquímicos secretados pelas raízes de arroz e têm demonstrado resultados promissores no controle de várias espécies de plantas daninhas (KATO-NOGUCHI, 2010). Variedades de arroz estão sendo selecionadas e melhoradas para expressar tal efeito alelopático (OLOFSDOTTER et al., 2002). Embora o nível de controle de plantas daninhas, até o momento, não seja equivalente ao obtido com herbicidas convencionais, as taxas de uso desses herbicidas são significativamente reduzidas nos campos plantados com variedades de arroz alelopático. Kato-Noguchi et al. (2013) observaram que monilactonas A e B inibem a germinação de sementes de *Arabidopsis* por inibirem o processo de degradação das proteínas de reserva cruciferim e cruciferina. Apesar deste resultado, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação dessas momilactonas (KATO-NOGUCHI, 2011).

Para Duke et al. (2000), compostos naturais têm várias vantagens sobre os compostos sintéticos quando apresentam bioatividade. Um dos motivos é que compostos naturais podem apresentar mecanismo de ação novo devido a maior

diversidade de estrutura molecular (BHOWMIK, 2003) agindo de forma incomum a dos mecanismos de ação de herbicidas utilizados hoje, sendo, portanto, menos possível encontrar populações resistentes.

Ácido *p*-metoxicinâmico (AMC)

Grande parte dos estudos no campo da alelopatia está voltada para o isolamento e identificação de estruturas dos compostos que causam efeito alelopático. Dentre estes estudos, estão aqueles que utilizam a palhada de culturas anuais como matéria-prima para a descoberta de um novo aleloquímico. Este foi o caso de um grande trabalho realizado em conjunto com diversas áreas do conhecimento na Universidade Estadual de Maringá, incluindo o Laboratório de Bioquímica de Plantas, onde o presente trabalho foi conduzido.

A palhada do milho foi particionada em solventes com diferentes polaridades sendo, então, testadas as frações resultantes na germinação e ou crescimento vegetal de outra planta. A fração hidrometanólica apresentou maior atividade alelopática em plantas de soja, milho e plantas daninhas (MARCHIOSI, 2012). Na daninha *Euphorbia heterophylla*, o crescimento das raízes foi significativamente reduzido bem como a atividade da fenilalanina amônia liase e peroxidase ligada à parede celular. Foram observados também intumescimento e redução da zona de alongamento da raiz, danos físicos visíveis em microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de redução da viabilidade celular. No entanto, não foi observado estresse oxidativo nas plantas (SILVA, 2013). Com base nestes resultados, foi realizada a caracterização química do extrato hidrometanólico, que revelou elevada concentração do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC - dados não divulgados), sugerindo que este composto pode ser o principal responsável pelo efeito alelopático.

AMC é um composto orgânico aromático derivado do ácido cinâmico (Figura 2).

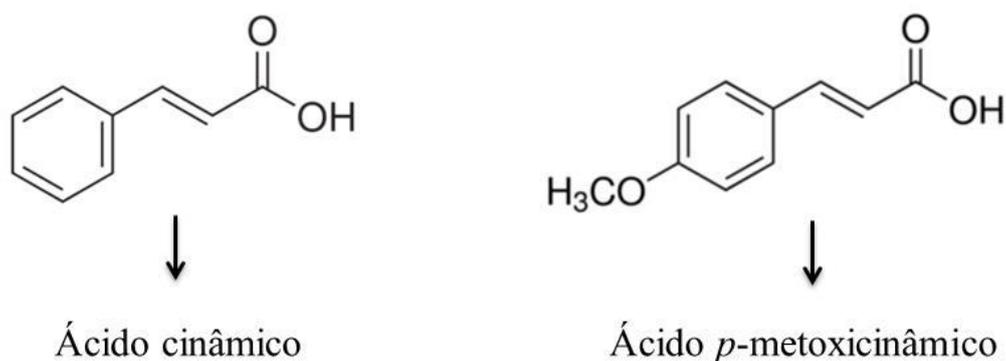


Figura 2. Estrutura química do ácido cinâmico e do ácido *p*-metoxicinâmico.

Existe indício do AMC ser um dos precursores da cumarina herniarina em algumas plantas, porém sua via de síntese e sua função não estão claramente elucidada. O AMC está presente em grãos de *Oriza sativa*, nas plantas de *Curcuma longa* e na *Kaempferia galanga* (BROWN, 1965; STRACK, 1997; HUDSON et al., 2000). O estudo da atividade biológica deste composto vem ganhando o interesse de pesquisadores nos últimos anos, principalmente nas áreas médicas e farmacológicas. Em animais, sua ação está ligada a proteção celular e, também, propriedades vaso relaxantes. Por exemplo, o AMC pode impedir a proliferação de células ligadas ao câncer de cólon e apresentar atividade hepatoprotetora (KIM et al., 2002; LEE et al., 2002; OTHAMAN et al., 2006; SIVAGAMI et al., 2012). Além disso, derivados do AMC são amplamente utilizados na indústria de cosméticos para a produção de protetores solares contra a ação dos raios UVB (290-320 nm). Embora a investigação do AMC como fármaco ser crescente, escassos são os estudos deste composto no campo da alelopatia. Um dos poucos trabalhos nessa área aponta o AMC como promissor nematicida contra o *Meloidogyne incognita* na fase juvenil, alcançando mortalidade acima de 97% (MAHAJAN et al., 1992).

Euphorbia heterophylla

A planta daninha *Euphorbia heterophylla*, popularmente conhecida como amemdoim-bravo, leiteiro ou leiteira, flor-de-poetas ou café-do-diabo, pertence à família Euphorbiaceae e é uma planta anual e latescente, característico das plantas desta família. Possui porte ereto de 30-80 cm de altura, folhas glabras ou levemente pubescentes, de forma bastante variável medindo entre 4-10 cm de comprimento, sendo

que as inferiores apresentam disposição alternada e as superiores opostas. A base do caule pode ser esbranquiçada ou vermelho brilhante.

E. heterophylla se reproduz sexuadamente produzindo sementes e seus frutos apresentam três lóbulos que explodem quando maduros, dispersando as sementes de 2 a 5 m ou mais da planta mãe (LORENZI, 2006). As sementes germinam rapidamente em temperaturas alternadas de 25 a 35°C. A emergência é maior, 40 a 47% de germinação, quando as sementes estão entre 0-8 cm de profundidade no solo e cai para 22% a 10 cm, 12% a 12 cm e 0 a 14 cm. Comparadas às outras plantas daninhas, sua capacidade de germinar em tais profundidades aumenta a competitividade em relação à cultura e dificulta do controle de *E. heterophylla* (FAO, 2015).

Agressiva em regiões de clima quente, esta planta daninha tem centro de origem na América do Sul (DARLINGTON & WYLIE, 1955). É uma diploide ($2n=28$ cromossomos) que sofreu poliploidização ($2n=56$ cromossomos) em outros centros de dispersão para adaptação nas mais diversas regiões do mundo. Sementes recém-colhidas de áreas tropicais não apresentam dormência, mas a latência é comum durante temperaturas mais baixas do inverno. Trata-se de uma adaptação, pois plantas que dariam início ao crescimento no final da estação quente seriam mortas por temperaturas de inverno. As sementes germinam durante um período prolongado no campo e as plantas crescem muito rapidamente, por isso são muito competitivas com as culturas e podem cobrir completamente uma cultura de soja dentro de 2 a 3 semanas após a emergência. É citada como problema durante o ciclo de cultivo de legumes, pastagens e particularmente em soja, ervilha, milho e cana-de-açúcar (FAO, 2015).

No Brasil, *E. heterophylla* infesta mais de 25% dos campos de soja e é uma dicotiledônea com elevada incidência na região Sul, estando presente em 74% das áreas de soja na região do Planalto do Estado do Rio Grande do Sul (BIANCHI, 1996). KARAM et al. (1993) observaram significativas reduções de produtividade da soja, onde uma infestação de 42,5 plantas m^2 de *E. heterophylla* reduziu a produção em 30%, em média. É uma espécie alógama, produz até 3.000 sementes por planta e pode reduzir o rendimento de grãos da cultura da soja em até 80% (KISSMANN & GROTH, 1992). BIANCO et al. (2007) destacaram que essa planta daninha é um forte competidor por nutrientes com a soja, sobretudo no 21 estágio de florescimento, período em que a soja tem maior requerimento nutricional. Outros resultados mais preocupantes indicam que apenas uma ou duas plantas daninhas 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 da produção da cultura (CARVALHO et al., 2010).

Diversos herbicidas são utilizados no controle de *E. heterophylla*, incluindo o 2,4-D, acifluofen, fomesafen, oxyfluofen, bentazon, lactofen, imazetapir, imazaquin e chlorimuron. Herbicidas a base de triazina, como atrazina e metribuzin, podem estabelecer um controle aceitável por várias semanas (especialmente quando as chuvas são abundantes após a aplicação), mas raramente para a temporada completa. Uréias substituídas, tais como linuron e diuron, não possuem nenhum efeito sobre esta erva daninha (FAO, 2015).

REFERÊNCIAS

ABRAHIM, D., FRANCISCHINI, A. C., PERGO, E. M., KELMER-BRACHT, A. M., ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of alpha-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v 41, p 985–991, 2003a.

ABRAHIM, D., TAKAHASHI, L., KELMER-BRACHT, A. M., ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of phenolic acids and monoterpenes on the mitochondrial respiration of soybean hypocotyls. **Allelopathy Journal**, v 11, p 21–30, 2003b.

ALVES, M. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V 39, n 11, p 1083-1086. 2004

BAIS, H. P., VEPACHEDU, R., GILROY, S., CALLAWAY, R. M., VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, p 1377–1380, 2003.

BAZIRAMAKENGA, R., LEROUX, G. D., SIMARD, R. R., ANDNADEAU, P. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v 75, p 445–450, 1997.

BATISH, D. R., SINGH, H. P., KAUR, S., KOHLI, R. K., YADAV, S. S. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p 297–305, 2008

BHOWMIK, P. C., INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v. 22, p. 661-671, 2003.

BIANCHI, M. A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: **Reunião de pesquisa de soja da região sul**, 23, Porto Alegre, RS. Ata e Resumos, 125p., 1996.

BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; CARVALHO, L. B. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* (L.) Merr. e *Euphorbia heterophylla* L. **Ensaio e Ciência**, v. 11, n. 2, p. 61-72, 2007.

BROWN, S. T. Biosynthesis of Coumarins. In: BILLEK, G. (Ed.). **Biosynthesis of Aromatic compounds. Proceedings of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies**. v.1, cap. 2, Vienna: Pergamon, 1965. p.15-20.

BORGES, W. L. B., FREITAS, R. S., MATEUS, G. P., SÁ, M. E., ALVES, M.C. Cover crops for the northwest region from Sao Paulo State, Brazil. **Ciência Rural**. v. 45, p 799–805. 2015.

CAMBIER, V.; HANCE, T.; DE-HOFFMAN, E. Non-injured maize contains several 1,4-benzoxazin-3-one related compounds but only as glucoconjugates. **Phytochemical Analysis**, v 10, p 119-126, 1999.

CARVALHO, L. B., BIANCO, S., GUZZO, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in macronutrient accumulation of soybean. **Planta Daninha**, v. 28, n 1, p 33-39, 2010.

CHENG, F., CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v 6, p 1020-1026, 2015.

CHUAH, T. S., NORHAFIZAH, M. Z., ISMAIL, B. S. Evaluation of the biochemical and physiological activity of the natural compound 2,4-ditert-butylphenol on weeds. **Crop & Pasture Science**. v. 66, P 214-223, 2015.

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

DARLINGTON, C. D., WYLIE, A. P. Chromosome atlas of flowering plants. - In: MARTIN CIUDAD, A. **Numeros cromosomáticos de plantas vasculares ibéricas I.** – Madrid, 1955.

DAYAN, F. E., DUKE, S. Natural compounds as next generation herbicides. **plant physiology**, v 166, p 1090-1105, 2014.

DAYAN, F. E., CANTRELL, C. I., DUKE, S. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v 17, p 4022-4034, 2009

DAYAN, F. E. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in Sorghum bicolor. **Planta**, v. 224, p 339–346, 2006.

DING, J., SUN, Y., XIAO, C. L., SHI, K., ZHOU, Y. H., YU, J. Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p 3765–3773, 2007;

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

EINHELLIG. F.A. Allelopathy. **Mechanism of action of allelochemicals in Allelopathy**. ACS Symposium Series 582, American Chemical Societies. Washington, D.C. 1995.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Euphorbia heterophylla* L., 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/biodiversity/weeds/listweeds/eup-het/en/>>. Acesso em: 29/06/2015.

FRIEDMAN, J., WALLER, G. R. Allelopathy and autotoxicity. **Trends in Biochemical Sciences**, v.10, p. 47-50, 1985.

HALLAK, A. M. G., DAVID, L. C., SOUZA, I. F. Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. **Genetics and Molecular Biology**, v 22, p 95–99, 1999.

HARUN, M. A. Y. A., ROBINSON, R. W., JOHNSON, J., UDDIN, M. N. (2014). Allelopathic potential of *Chrysanthemoides monilifera subsp. monilifera* (bone seed): a novel weapon in the invasion processes. **South Africa Journal. Bot.** v 93, p 157–166, 2014.

HUDSON, E. A., DINH, P. A., KOKUBURN, T., SIMMONDS, M. S. J., GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 1163-1170, 2000.

INDERJIT, WARDLE, D. A., KARBAN, R., CALLAWAY, M. R. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Ecology and Evolution**, v. 26, n.12, p. 655-662, 2011.

INDERJIT; KEATING, K. I. Allelopathy: Principles, procedures, processes, and promises for biological control. **Advances in Agronomy**, v. 67, p. 141-231, 1999.

ISHII-IWAMOTO, E. L.; ABRAHIM, D.; SERT, M. A.; BONATO, C. M.; KELMER-BRACHT, A. M.; BRACHT, A. Mitochondria as a site of allelochemical action. In: **Allelopathy: A Physiological Process With Ecological Implications**; REIGOSA, M.J., PEDROL, N., GONZÁLEZ, L., Eds. (Org) Springer Science, Netherlands, 2006, pp. 267-284.

ISHII-IWAMOTO, E. L. C., PERGO, E. M.; REIS, B.; MOSCHETA, I. S.; BONATO, C. M. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, p. 50-64, 2012.

JASICKA-MISIAK, I., WIECZOREK, P. P., KAFARSKI, P. Crotonic acid as a bioactive factor in carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Phytochemistry**, v.66, n. 12, p.1485-1491, 2005.

KARAM, D. et al. Estudo da interferência das plantas daninhas com a cultura da soja. In: **Congresso brasileiro de plantas daninhas**, Londrina. Resumos... Londrina: SBCPD, p. 32-33. 1993.

KATO-NOGUCHI H, HASEGAWA M, INO T, OTA K, KUJIME H. Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. **Journal of Plant Physiology**, v 167, p 787–791, 2010.

KATO-NOGUCHI, H. Barnyard grass-induced rice allelopathy and momilactone B. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p 1016–1020, 2011

KATO-NOGUCHI, H., OTA, K., KUJIME, H., OGAWA, M. Effects of momilactone on the protein expression in *Arabidopsis* germination. **Weed Biology Management**, v 13, p 19–23, 2013.

KIM, S. R., SUNG, S. H., JANG, Y. P., MARKELONIS, G. J., OH, T. H., KIM, Y. C. E-p-methoxycinnamic acid protects cultured neuronal cells against neurotoxicity induced by glutamate. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1281-1291, 2002.

KISSMANN, K. G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 789 p, 1992.

LEATHER, G. R., Weed control using allelopathic sunflowers and herbicide. **Plant Soil.**, v. 98, p. 17–23, 1987.

LEE, S. R., KIM, K. J., KIM, Y. C. Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl₄ induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. **Planta Medica**, v. 68, p. 407-441, 2002.

LIN, W. X. Effect of self-allelopathy on AOS of *Casuarina equisetifolia* forst seedling. Fujian. **Journal of Agriculture Science**, v 25, p 108–113, 2010.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa, 6^o ed., Plantarum, 269 p, 2006.

LOTINA-HENNSEN B, KING-DIAZ B, AGUILLAR, M. I., HERNANDEZ TERRONES, M. G. Plant secondary metabolites. **Targets and mechanism of allelopathy**. In: REIGOSA M J, PEDROL N E GONZÁLEZ L. (eds). Alleopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. Springer, Dordrecht, p. 229-265. 2006.

MACÍAS, F. A., GALINDO, J. C. G., CASTELLANO, D., VELSACO, R. F. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicide models (II) guianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000.

MACÍAS, F. A.; OLIVEROS-BASTIDA, A.; MARIN, A.; CASTELLANO, D.; SIMONET, A.; MOLINILLO, J. M. G. dEgradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from gramineae. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v 52, 6402-6413, 2004.

MAHAJAN, R., KAUR, D. J., BAJAJ, K. L. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 20, p. 217-219, 1992.

MARCHIOSI, R. Efeitos do L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina) e extratos de mucuna e milho sobre o crescimento e trocas gasosas de plantas de soja (*Glycine max* L. Merril). Tese. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2012.

MEAZZA, G.; SCHEFFNER, B. E.; TELLEZ, M. R.; RIMANDO, A. M.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; ABOURASHED, E. A.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Phytochemistry**, v.60, n.3, p.281-288, 2002.

MÉNDOZA JL, JIMÉNEZ M, LOTINA-HENNESEN B. Piquerol A and diacetyl piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. **Pest Science**, v 40, p 37-40, 1994.

MORELAND, D. E., NOVISTZKY, W. P. **Effects of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria.** American Chemistry Society Symposium Ser, v 330, p 247-261, 1987.

NIMBAL, C. I.; PEDERSEN, J. F.; YERKES, C.N.; WESTON, L. A.; WELLER, S.C, Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 44, p 1343–1347, 1996.

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, p 1187–1203, 2005.

OLOFSDOTTER, M., JENSEN, L. B., COUTORIS, B. Improving crop competitive ability using allelopathy – an example from rice. **Plant Breeding**, v 121, p 1, 2002.

OTHAMAN, R., IBRAHAIM, H., MOHD, A. M., MUSTAFA, M. R., AWANG, K. Biossay guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kampferia galangal* L. **Phytomedicine**, v. 13, p. 61-66, 2006.

PEREZ, F. J., NUNEZ, J. O. Root exudates of wild oats. Allelopathic effect on spring wheat. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2199-2202, 1991.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., EPIFANEO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POONPAIBOONPIPAT, T., PANGNAKORN, U., SUVUNNAMEK, U., TEERARAK, M., CHAROENYING, P., LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crop and Products**, v 41, p 403–407, 2013.

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. Tese de mestrado. **Universidade Estadual de Maringá. Brasil**, 2011.

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

SALING, S. C., COMAR, J., F., MITO, M. S., PERALTA, R. M., BRACHT, A. Actions of juglone on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, p 319-327, 2011.

SAMPIETRO, D. A., VATTUONE, M. A., ISLA, M. I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 837-846, 2006.

SANTOS, W.D., FERRARESE, M. L. L., FINGER, A., TEIXEIRA, A. C. N., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v 30, p 1199-1208, 2004.

SANCHEZ-MOREIRAS, A. M., DE LA PENA, T. C., REIGOSA, M. J. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. **Phytochemistry**, v 69, p 2172–2179, 2008.

SHAO, J., WU, Z., YU, G., PENG, X., LI, R. Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): from views of gene expression and antioxidant system. **Chemosphere**, v 75, p 924–928, 2009.

SCHULZ, M., MAROCCO, A., TABAGLIO, V., MACIAS, F. A., MOLINILLO, J. M. Benzoxazinoids in rye allelopathy—from discovery to application in sustainable weed control and organic farming. **Journal of Chemical Ecology**, v39, p 154–174, 2013.

SILVA, H. A. Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre alguns aspectos do metabolismo e crescimento de amendoim-bravo. Tese de mestrado. **Universidade Estadual de Maringá**. 2013.

SIVAGAMI, G., KARTHIKKUMAR V., BALASUBRAMANIAN, T., NALINI, N. The modulatory influence of p-methoxycinnamic acid, an active rice bran phenolic acid, against 1,2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 196, n. 1-2, p. 11-22, 2012.

SEVERINO, F. J., CARVALHO, S. J. P., CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio: II - implicações sobre as plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 53-60, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S., RODRIGUES, L. R. A., RODRIGUES, T. J. D. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M. e HARBONE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. San Diego/London: Academic Press, 1997. p.387-416.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3.ed. 722p., 2009.

TANG, C.S.; CAI, W.F.; KOHL, K.; NISHIMOTO, R.K. **Plant Stress and Allelopathy**. ACS symposium Series 558; American Chemical Society. Washington, DC, pp. 142-157, 1995.

- TOKURA, L. K., NOBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.
- TREZZI, M. M., VIDAR, R. A., BALBINOT-JUNIOR, A. A., BITTENCOURT, H. H., SOUZA FILHO, A. P. S. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture. **Journal of Plant Interactions**, v 11, p 56-60. 2016.
- TREZZI, M. M., VIDAL, R. A.; DICK, D. P.; PERALBA, M. C. R.; KRUSE, N. D. Sorptive behavior of sorgoleone in ultisol in two solvent systems and determination of its lipophilicity. **Journal of Environmental Science Health Part B – Pestic Food Contam Agric Wastes**, v. 41, p 345–356, 2006.
- UDDIN, M. R., PARK, S. U., DAYAN, F. E., ANDPYON, J. Y. Herbicidal activity of formulated sorgoleone, a natural product of sorghum root exudate. **Pest Management Science**, v 70, p 252–257, 2014.
- UDDIN, M. R.; WON, O.; JANDPYON, J. Y. Herbicidal effects and crop selectivity of sorgoleone, a sorghum root exudate under greenhouse and field conditions. **Korean Journal Weed Science**, v 30, p 412–420, 2010.
- WEDENHAMER, J. D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**. Madison, v 88, n 6, p 866-75. 1996
- WEDENHAMER, J. D. HARTNETT, D. C.; ROMEO, J. T. Density dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal of Applied Ecology**. Oxford, v 26, p 613-24, 1989.
- WEIR, T. L, PARK, S. W., VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**. v 7, p. 472–479, 2004.
- WESTON, L. A. History and current trends in the use of allelopathy for weed management. **Hort Technology**. n 15, v 3. 2005.
- WESTON, L. A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 860–866, 1996.
- YE, S. F., ZHOU, Y. H., SUN, Y., ZOU, L. Y., YU, J. Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of Fusarium wilt. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 255-262, 2006.
- YU, J. Q., YE, S. F., ZHANG, M. F., HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p 129–139, 2003.
- ZUO, S. P., MA, Y. Q., YE, L.T. In vitro assessment of allelopathic effects of wheat on potato. **Allelopathy Journal**. v 30, p 1–10. 2012.

CAPÍTULO 1

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento radicular e viabilidade celular de plantas de *Euphorbia heterophylla*

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento radicular e viabilidade celular
de plantas de *Euphorbia heterophylla*

RESUMO

A diversidade de compostos com ação alelopática tem ganhado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, principalmente aqueles com efeito alelopático negativo sobre o crescimento de plantas daninhas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) em plantas de *Euphorbia heterophylla*. Foi avaliado a taxa de crescimento das raízes, o consumo de solução nutritiva, o teor relativo de água, o índice mitótico, a quantidade de aminoácidos totais e a viabilidade celular dos ápices radiculares. Plântulas de 5 dias foram cultivadas em sistema hidropônico durante 48 h, em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 h e temperatura de 30°C dia / 22°C noite. Para avaliação da taxa de crescimento, foram utilizadas 8 concentrações (0,10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µM). Para a avaliação das demais variáveis, os tratamentos foram constituídos das concentrações de inibição de crescimento em 50 e 80%, mais o tratamento controle sem o ácido. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições. Os resultados revelaram que a ação fitotóxica do AMC no crescimento radicular de *E. heterophylla* pode estar relacionada a diminuição do índice mitótico e que a perda de viabilidade celular, para a maior concentração testada, pode indicar que outro alvo de ação do composto esteja sendo atingido.

Palavras-chave: Alelopatia. Planta daninha. Crescimento inicial radicular. Aminoácidos.

p-Methoxycinnamic acid effects on root growth and cell viability of *Euphorbia heterophylla*

ABSTRACT

The diversity of compounds with allelopathic action have gained interest of researchers around the world especially those with negative effects on the weeds growth. The aim of this study was to evaluate the effects of *p*-methoxycinnamic acid (MCA) on the *Euphorbia heterophylla* root seedlings. It was measured the root growth rate, nutrient solution consumption, relative moisture content, mitotic index, total amino acids amount and the viability of root apices. Five-day-old seedlings were cultivated in nutrient solution for 48 h in a growth chamber, photoperiod of 14 h and 30 °C light/22 °C dark. For evaluation of growth rate, it were used 8 concentrations (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µM). The other variables, the treatments consisted of growth inhibition concentrations in 50 and 80% over the control without acid. All the experimental design was a completely randomized design with 4 replicates each. The results revealed that the phytotoxic action of MCA on root growth of *E. heterophylla* can be related to reduction on mitotic index and the loss of cell viability to the highest concentration may indicate that other site of action is being achieved.

Keywords: Allelopathy. Weed. Initial root growth. Amino acids.

1. INTRODUÇÃO

A alelopatia é um fenômeno natural muito comum em comunidades de plantas, podendo ser definida como uma interferência provocada pela liberação de substâncias químicas no ambiente, que afeta de modo positivo ou negativo o crescimento e o desenvolvimento de plantas e organismos vizinhos. Essas substâncias químicas, também conhecidas como aleloquímicos, são de grande interesse para a ciência da alelopatia devido a sua grande diversidade química e heterogeneidade de respostas biológicas. Somado a isso, os aleloquímicos representam uma área promissora para a agricultura atual, que busca o manejo de áreas agrícolas com menor degradação ambiental.

A principal fonte de substâncias químicas alelopáticas provém do metabolismo secundário vegetal, que estão classificados como terpenoides, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos representam um dos grupos com destacados efeitos alelopáticos, especialmente os derivados dos ácidos cinâmico e benzoico (tais como os ácidos clorogênico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, gálico e salicílico), os quais têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. A ação destes compostos naturais envolve diferentes processos metabólicos, como inibição da germinação de sementes, diminuição do crescimento radicular, aumento da lignificação, indução do estresse oxidativo, diminuição da absorção de nutrientes e mudanças no processo fotossintético (BARKOSKY et al., 2000; YE et al., 2006; ABENAVOLI et al., 2010; BUBNA et al., 2011; LIMA et al., 2013).

O ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) é um composto orgânico aromático derivado do ácido cinâmico. Há indícios de ser um dos precursores da cumarina herniarina e está presente em grãos de *Oriza sativa*, nas plantas de *Curcuma longa* e na *Kaempferia galanga* (BROWN, 1965; STRACK, 1997; HUDSON et al., 2000). O estudo da atividade biológica deste composto vem ganhando o interesse de pesquisadores nos últimos anos, principalmente nas áreas médicas e farmacológicas. Em animais, sua ação está ligada a proteção celular e, também, propriedades vaso relaxantes. Por exemplo, o AMC pode impedir a proliferação de células ligadas ao câncer de cólon e apresentar atividade hepatoprotetora (KIM et al., 2002; LEE et al., 2002; OTHAMAN et al., 2006; SIVAGAMI et al., 2012). Além disso, derivados do AMC são amplamente utilizados na indústria de cosméticos para a produção de protetores solares contra a ação dos raios UVB (290-320 nm). Embora a investigação do AMC como fármaco seja crescente,

escassos são os estudos deste composto no campo da alelopatia. Um dos poucos trabalhos nessa área aponta o AMC como promissor nematicida contra o *Meloidogyne incognita* na fase juvenil, alcançando mortalidade acima de 97% (MAHAJAN et al., 1992).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram a atividade alelopática do extrato hidrometanólico proveniente de palhada do milho (*Pennisetum glaucum*) sobre a planta daninha *Euphorbia heterophylla*. A caracterização química deste extrato revelou elevada concentração de AMC (dados não divulgados), sugerindo que este composto deve ser o principal responsável pelo efeito alelopático do milho sobre a planta daninha. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi monitorar os efeitos do AMC no crescimento inicial de *Euphorbia heterophylla*, a fim de avaliar seu potencial alelopático nesta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e condução experimental

As sementes de *E. heterophylla* foram obtidas da empresa Agro Cosmos Ltda, produtora nacional de sementes de plantas daninhas. O AMC foi adquirido da Sigma Chemical Co.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN), localizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá-Paraná.

2.2 Obtenção das plantas

Sementes de *E. heterophylla* foram previamente desinfestadas com NaClO 2% durante 2 minutos, lavadas com água destilada e dispostas em papel de germinação Germitest (CEL-060) previamente autoclavados e umedecidos com água deionizada. Os rolos confeccionados foram acondicionados em recipientes de vidro contendo pequeno filme de água para a manutenção da umidade. Os frascos contendo os rolos foram envoltos com sacos plásticos transparentes e perfurados para permitir a passagem de luz e oxigênio, sendo, em seguida, levados à câmara de germinação (Eletrolab – EL 202) com temperatura controlada (25°C constantes) e fotoperíodo de 12 h. As sementes germinaram por um período de 5 dias.

2.3 Sistema experimental, cultivo e tratamento das plantas

Após os 5 dias de germinação, as plântulas foram incubadas em solução nutritiva para cultivo hidropônico. O sistema experimental era constituído de um recipiente de vidro medindo 15 x 9 cm (altura x diâmetro) e de uma placa de acrílico contendo 25 perfurações utilizada para o suporte das plantas. Durante o período de incubação (48 h) as raízes das plantas permaneceram imersas em 500 mL de solução nutritiva (DONG et al., 2006), contendo AMC nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µM. Na região ocupada pelas raízes, cada sistema foi envolto por um tecido preto com o objetivo de evitar a passagem de luz para a solução nutritiva, que permaneceu sob

aeração contínua, com auxílio de uma bomba compressora. O sistema experimental contendo as plantas foi mantido em sala para crescimento de plantas sob intensidade luminosa de $400 \mu\text{mols de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 14h e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a noite. O tempo de incubação das plantas foi de 48 h.

2.4 Variáveis biom\u00e9tricas

O efeito do AMC sobre a taxa de crescimento das ra\u00edzes de *E. heterophylla* foi calculado por meio da diferen\u00e7a entre os comprimentos inicial e final das ra\u00edzes nos tempos 0 e 48 h do per\u00edodo de incubação, respectivamente. O comprimento da raiz foi medido com o aux\u00edlio de uma r\u00e9gua milimetrada, mensurando a raiz do \u00e1pice at\u00e9 o colo da planta. Os resultados foram expressos em percentagem, considerando as plantas controle com 100% de crescimento.

2.5 Consumo de solu\u00e7\u00e3o nutritiva

A capta\u00e7\u00e3o de solu\u00e7\u00e3o nutritiva pelas plantas foi monitorada pela determina\u00e7\u00e3o do volume de solu\u00e7\u00e3o absorvido durante o per\u00edodo de incubação. Para isso, no momento da incubação, 500 mL de solu\u00e7\u00e3o nutritiva foram minuciosamente medidos em proveta graduada e adicionados a cada sistema experimental. Ao t\u00e9rmino do per\u00edodo de incubação, o volume de solu\u00e7\u00e3o nutritiva do recipiente contendo as plantas foi novamente aferido. Para descontar as perdas de solu\u00e7\u00e3o nutritiva por evapora\u00e7\u00e3o, um sistema experimental desprovido de plantas permaneceu sob ilumina\u00e7\u00e3o durante todo o per\u00edodo de incubação. O volume de solu\u00e7\u00e3o nutritiva absorvido pelas plantas foi calculado por meio da seguinte equa\u00e7\u00e3o: $VC = (V_i - V_f) + V_t$, onde: VC = volume de solu\u00e7\u00e3o consumido; V_i = volume inicial de solu\u00e7\u00e3o nutritiva; V_f = volume final de solu\u00e7\u00e3o nutritiva e V_t = volume de solu\u00e7\u00e3o nutritiva perdido por evapora\u00e7\u00e3o.

2.6 Teor relativo de \u00e1gua das ra\u00edzes

O teor relativo de \u00e1gua (TRA) foi avaliado ap\u00f3s 48 h de tratamento. Para isso as ra\u00edzes das plantas foram lavadas em \u00e1gua corrente, secas em papel toalha e imediatamente pesadas em balan\u00e7a digital (peso da mat\u00e9ria fresca). Em seguida, as

raízes foram colocadas para hidratar em água deionizada até peso constante (peso túrgido). As raízes foram, então, colocadas em estufa à 60°C por 72 h para obtenção do peso da matéria seca. O TRA foi calculado pela fórmula: $TRA = (PF - PS) / (PT - PS) \times 100$, onde: TRA = teor relativo de água (expresso em porcentagem); PF = peso da matéria fresca; PS = peso da matéria seca e PT = peso túrgido.

2.7 Índice mitótico

Raízes dos diferentes tratamentos foram inicialmente coletadas e excisadas a dois centímetros a partir do ápice radicular. As amostras foram imersas em fixador Farmer (3:1 etanol:ácido acético glacial) (JENSEN, 1962) durante 2 h em temperatura ambiente e, em seguida, conservadas em solução de etanol 70% até análise. Para determinação do índice mitótico, as amostras foram tratadas com ácido clorídrico 1 M por 20 min a 60°C, lavadas em água destilada e, então, coradas comorceína acética 2% por 45 min a temperatura ambiente. Após este período, os ápices foram lavados em água destilada para remoção do excesso de corante e colocados em lâmina de microscópio de luz. Após o esmagamento, as amostras foram levadas ao microscópio para contagem de células. Para cada tratamento foram analisados 5 ápices, contando pelo menos 1000 células cada. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células vezes 100.

2.8 Quantificação de aminoácidos

2.8.1 Extração genérica

Após o período de incubação, as raízes foram coletadas, lavadas em água deionizada e, posteriormente, enxugadas em papel absorvente. Toda raiz foi macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de pistilo e cadinho. Em seguida, 0,5 g desse material foi adicionado em tubo de ensaio graduado contendo 5 mL de metanol:clorofórmio:água (MCW), na proporção 12:5:3 (BIELESKI & TURNER, 1996). Após 24 h, à 25°C, o extrato foi centrifugado a 7000 rpm por 9 min. O sobrenadante foi reservado em proveta e o precipitado ressuspendido com 2,5 mL de MCW e homogeneizado com auxílio de bastão de vidro por 10 min. As amostras foram centrifugadas novamente e, em seguida, uniu-se os sobrenadantes. Para cada 2 mL da

fração, adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água. Após vigorosa agitação, a solução permaneceu em repouso por 24 h. No decorrer deste período, ocorreu a separação das fases, sendo retirada a fase aquosa superior com o auxílio de pipeta de Pasteur, descartando-se a fase clorofórmica.

A fase aquosa foi submetida a banho-maria 38°C por 18 h para eliminação do clorofórmio remanescente e, conseqüentemente, concentração das amostras. Ao final do processo, mediu-se o volume final das amostras que, posteriormente, foram conservadas em freezer até determinação do teor de aminoácidos.

2.8.2 Derivatização e quantificação de aminoácidos livres

A determinação dos teores dos aminoácidos livres foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após derivatização com *o*-ftaldialdeído (OPA), como descrito por Marur et al. (1994).

A solução de derivatização foi inicialmente preparada dissolvendo-se 50 mg de OPA em 1 mL de metanol grau cromatográfico. Em seguida, foram adicionados à solução de OPA 6,5 mL de tampão borato-NaOH pH 9,5 (ácido bórico 2,4% p/v em H₂O deionizada; pH ajustado com NaOH 2 M). Após ser filtrada em membrana Millipore, a mistura foi reservada em geladeira. No dia de uso, 5 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados à 625 µL da solução de derivatização.

Uma alíquota de 200 µL de amostra ou padrão foi adicionada a 600 µL da solução de derivatização contendo 2-mercaptoetanol, agitando-se em seguida. Após 2 min de reação, a amostra foi filtrada através de membrana de politetrafluoretileno com poros de 0,45 µm e, então, analisada (20 µL) em cromatógrafo líquido de alta eficiência. O sistema cromatográfico (LC-20 Prominence HPLC system, Shimadzu[®], Japan) estava equipado com uma bomba de gradiente quaternário LC-20AT, um amostrador SIL-20A e um detector de fluorescência RF 20A ajustado com λ de excitação e de emissão de 265 e 480 nm, respectivamente. A separação dos derivados OPA-aminoácidos ocorreu em uma coluna de fase reversa Shimpack[®] CLC-ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), protegida com uma pré-coluna equivalente (10 x 4,6 mm). A eluição das amostras foi realizada com um gradiente linear gerado com os solventes A (acetato de sódio 50 mM, tetrahydrofurano 2% e metanol 2%) e B (metanol 65%), sob um fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção do solvente B, em relação ao solvente A, da seguinte maneira: 0 a 5 min – B aumentando de 20 a 28%; 5 a

40 min – B aumentando de 28 a 58%; 40 a 56 min – B aumentando de 75 a 95%; 56 a 60 min – B aumentando de 95 para 96%; 60 a 65 min – 100% de B. Após este tempo, o equipamento foi programado para retornar às proporções iniciais dos solventes. O tempo total de corrida foi de aproximadamente 80 min.

Os aminoácidos identificados e quantificados foram: aspartato (Asp), glutamato (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), arginina (Arg), glicina (Gly), treonina (Thr), alanina (Ala), tirosina (Tyr), metionina (Met), valina (Val), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile) e lisina (Lys). A concentração de cada aminoácido foi calculada de acordo com uma curva padrão e expressa em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de massa fresca.

2.9 Viabilidade celular

2.9.1 Viabilidade celular por método quantitativo

Após exposição ao AMC, as raízes foram excisadas e incubadas por 15 min em solução 0,25% de Azul de Evans. Em seguida, foram lavadas com água destilada por 30 min e, então, embebidas em 3 mL de N,N-dimetilformamida por um período de 50 min. A absorbância do Azul de Evans liberado foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm utilizando água deionizada como branco. A viabilidade celular foi expressa como a absorbância determinada a 600 nm (ZANARDO et al., 2009).

2.9.2 Viabilidade celular por método qualitativo

Os ápices radiculares (1,5 cm) das plantas expostas ao AMC foram seccionados e imersos por 5 s na solução de trabalho composta por 1 mL de iodeto de propídio 100 mg L^{-1} (preparado em água deionizada) e 20 μL de solução de diacetato de fluoresceína 5 g L^{-1} (preparado em acetona P.A.).

Os ápices foram visualizados em microscópio de fluorescência (Axioskop 2 plus, Carl Zeiz) e fotografados com câmara específica (AxioCam MRC high-resolution, Carl Zeiz) nos primeiros 3 min após a imersão na solução de trabalho. As imagens foram obtidas pelo método de dupla exposição. Inicialmente, a amostra foi exposta a luz verde usando filtro rhodamine, combinado com refletor 580 e filtros 510-560 nm e, em seguida, iluminada com luz azul, usando a combinação de filtros FITC e KP560 para obtenção da segunda imagem. As imagens foram transferidas para computador usando o

programa Axio Vision Rel software (v. 4.6) e analisadas no programa Image-Pro Plus (v. 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (HUANG et al., 1986).

2.10 Delineamento experimental e estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para a análise do efeito inibitório do AMC sobre o crescimento da raiz, foram realizados 8 tratamentos com 4 repetições, representados pelo controle e por 7 doses crescentes do AMC (10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μM). Após a construção de uma curva dose x resposta, calculou-se as concentrações que levaram a 50 e 80% de inibição do crescimento, denominadas I50 e I80, respectivamente. Dessa forma, para as demais variáveis, somente três tratamentos foram realizados [controle, I50 (47,64 μM) e I80 (190 μM)], com 4 repetições. A equação de regressão da variável taxa de crescimento da raiz foi obtida no programa Table Curve 2D e 3D, sendo escolhida aquela com melhor ajuste de acordo com o maior coeficiente de determinação. Para os demais experimentos, após a ANAVA ($p < 0,05$), foi realizado o teste t.

Para as análises qualitativas nenhum tratamento estatístico foi empregado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de químicos naturais afeta o crescimento e o metabolismo de muitas espécies vegetais e este fato nos incitou curiosidade acerca do AMC, a fim de avaliar seus efeitos como potencial aleloquímico. Os resultados obtidos demonstraram que a taxa de crescimento radicular da planta daninha *Euphorbia heterophylla* foi fortemente inibida pelas diferentes concentrações do ácido AMC (Figura 1). A inibição do crescimento radicular é uma característica comum dos aleloquímicos sobre plantas daninhas e plantas cultivadas como *Ipomoea triloba* (PERGO & ISHII-IWAMOTO, 2011), *Bidens pilosa*, *Ipomoea grandifolia* e *Senna obtusifolia* (PERGO et al., 2008), *Glycine max* (BUBNA et al., 2011; PARIZOTTO et al., 2015) e *Zea mays* (FERRO et al., 2015). O mesmo efeito foi observado no presente estudo, em que o comprimento das raízes de *E. heterophylla* foi reduzido com o aumento da concentração do AMC, indicando que esta espécie de planta daninha é sensível a este composto (Figura 1).

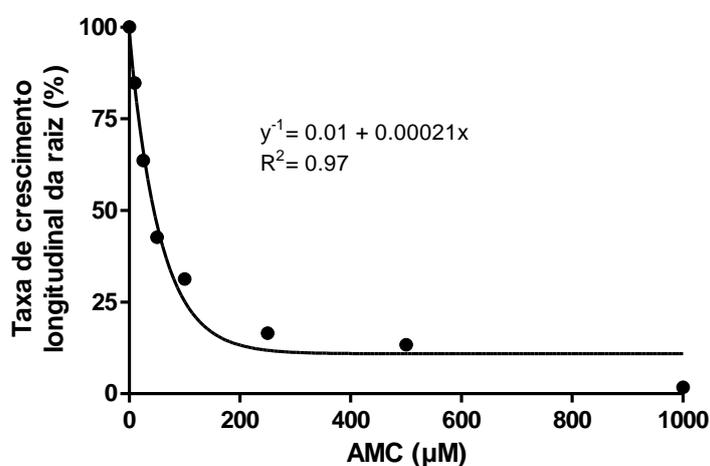


Figura 1. Taxa de crescimento longitudinal das raízes de *E. heterophylla*, submetidas às diferentes concentrações do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) ($p < 0,05$).

Com base na curva dose x resposta confeccionada para análise do crescimento da raiz, foram calculadas as concentrações que causaram 50 e 80% de inibição do crescimento, chamadas I50 (47,67 µM) e I80 (190 µM), respectivamente. Estas concentrações de AMC foram utilizadas nos experimentos subsequentes. Tal estratégia foi adotada para melhor estudar os efeitos do AMC sobre a planta daninha *E.*

heterophylla, de forma a garantir eficiência e acuracidade nas análises bioquímicas e fisiológicas.

A água e os sais minerais são elementos essenciais ao pleno crescimento e desenvolvimento vegetal. A limitação hídrica ou a carência de nutrientes pode comprometer drasticamente o estabelecimento das plantas no ambiente. Neste sentido, foi avaliado o consumo de solução nutritiva dos tratamentos. Como pode ser observado na Figura 2, a exposição das plantas de *E. heterophylla* ao AMC por 48 h resultou na redução do consumo de solução nutritiva. O controle apresentou maior consumo de solução, seguido pelo tratamento I80. O menor consumo foi observado para o tratamento I50. Estes resultados podem sugerir que o condicionamento hídrico das plantas tratadas tenha sido afetado, que, por sua vez, repercutiu na inibição do crescimento radicular.

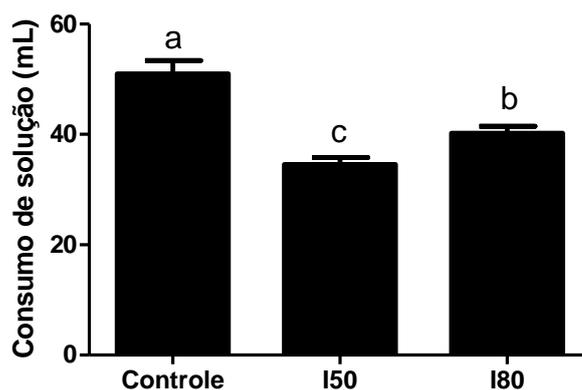


Figura 2. Volume de solução nutritiva consumido pelas plantas de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

Para constatar o status hídrico das plantas, tomou-se por modelo o teor relativo de água (TRA), que consiste na comparação entre as massas fresca e túrgida, expressando o resultado numa base percentual, considerando a massa seca (WEATHERLEY, 1951). Quanto mais próximo o valor de 100%, menor o déficit de água do órgão. O TRA das raízes de *E. heterophylla* tratadas ou não com o AMC não apresentou diferença estatística entre si (Figura 3). Os valores médios obtidos foram superiores a 95%, que leva a supor que o AMC não interferiu no condicionamento

hídrico das plantas e, conseqüentemente, este pode não ser a razão principal da inibição do crescimento observada nas raízes. Desta forma, o menor volume de solução nutritiva para os tratamentos I50 e I80 pode estar relacionado ao menor crescimento das raízes considerando que plântulas maiores consomem mais solução que plântulas menores. Na tentativa de desvendar o mecanismo de ação do AMC, foram realizadas análises citológicas e bioquímicas nas plantas tratadas de *E. heterophylla*.

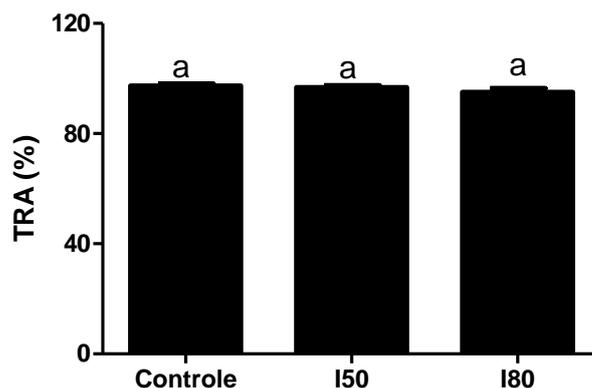


Figura 3. Teor relativo de água (TRA) das raízes de *E. heterophylla* nos diferentes tratamentos com o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

O índice mitótico (IM) é um parâmetro que vem sendo utilizado para avaliar o potencial alelopático de várias plantas e, muitas vezes, apresenta correlação positiva com o crescimento e percentagem de germinação (LUBER et al., 2015; PIRES et al., 2001; SANTOS et al., 2015). Neste sentido, foi avaliado o IM no meristema radicular das plantas de *E. heterophylla* tratadas com o AMC nas concentrações de inibição I50 e 80. A análise revela IM de 6,6% para as plantas controle, 4,8% para I50 e 2% para o I80 (Figura 4), ou seja, houve um decréscimo do IM com o aumento da concentração. Segundo Andrade et al. (2010), a inibição do crescimento radicular pode estar relacionada a paralisação da divisão celular na interfase, dificultando a prófase e, conseqüentemente, o crescimento celular. Pires et al. (2001) avaliaram o extrato aquoso de leucena sobre o IM em plântulas de milho. Neste estudo, os autores observaram uma correlação direta entre a inibição do crescimento radicular e a redução do IM e sugeriram que esta interferência pode representar um dos mecanismos de ação do extrato. No presente estudo, a redução do crescimento, acompanhada pela diminuição do IM, também pode sugerir que o AMC atue sobre a divisão celular.

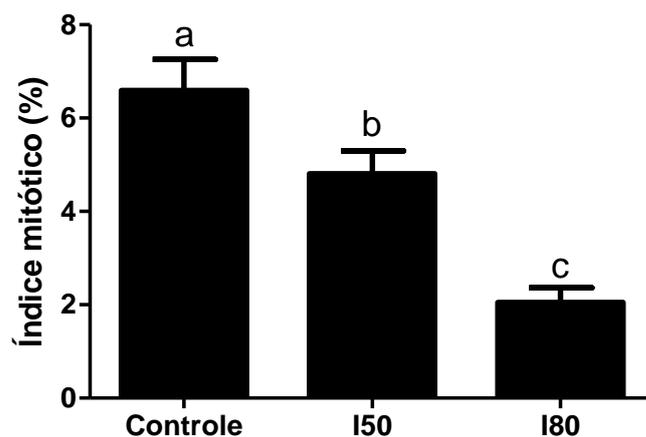


Figura 4. Índice mitótico dos ápices radiculares de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

O conhecimento do mecanismo de ação explicaria o motivo pelo qual determinada variável é afetada, porém, este ainda é um desafio, uma vez que compostos naturais podem agir em múltiplos alvos moleculares. Quando a análise do aleloquímico é conduzida para a descoberta de uma nova molécula com potencial herbicida, o pesquisador pode optar por realizar experimentos em sítios alvo de herbicidas sintéticos já conhecidos, no intuito de facilitar a busca de seu modo de ação (DAYAN et al., 2000). A inibição da síntese de aminoácidos, por exemplo, é o alvo de uma gama de herbicidas que, dependendo do grupo químico, bloqueiam a síntese de aminoácidos ramificados (inibidores da acetolactato sintase), aminoácidos aromáticos (inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase) ou de glutamina (inibidores da glutamina sintetase). Na tentativa de desvendar o mecanismo de ação do AMC nas plantas de *E. heterophylla*, uma análise comparativa foi realizada entre os efeitos do AMC sobre os teores de aminoácidos livres e os efeitos causados por herbicidas comerciais sobre os teores de aminoácidos aromáticos, de cadeia ramificada e de glutamina.

Tabela 1. Teores de aminoácidos livres nas raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico

Aminoácido	Controle	I50	I80
	μmol mg ⁻¹ de massa fresca		
Asp	0,3516 ± 0,046 b	0,5694 ± 0,032 a	0,6382 ± 0,009 a
Glu	0,4168 ± 0,006 b	0,6275 ± 0,056 a	0,6069 ± 0,016 a
Asn	164,4066 ± 7,728 b	222,7045 ± 8,644 b	487,5637 ± 65,841 a
Ser	0,5489 ± 0,011 b	0,6867 ± 0,026 b	1,0877 ± 0,077 a
Gln + His	2,0263 ± 0,201 c	3,1489 ± 0,161 b	4,2548 ± 0,335 a
Arg	0,6405 ± 0,055 b	0,5279 ± 0,028 b	1,0571 ± 0,167 a
Gly	0,2598 ± 0,008 b	0,2552 ± 0,017 b	0,6532 ± 0,044 a
Thr	0,0814 ± 0,001 c	0,1187 ± 0,005 b	0,2067 ± 0,015 a
Ala	0,1510 ± 0,034 b	0,1778 ± 0,025 b	0,3417 ± 0,038 a
Tyr	0,3776 ± 0,048 b	0,5371 ± 0,036 a	0,6213 ± 0,029 a
Met	0,0268 ± 0,001 a	0,0268 ± 0,001 a	0,0316 ± 0,003 a
Val	0,0666 ± 0,001 c	0,1051 ± 0,005 b	0,1205 ± 0,005 a
Phe	0,0362 ± 0,001 a	0,0396 ± 0,001 a	0,0401 ± 0,004 a
Ile	0,0332 ± 0,001 b	0,0432 ± 0,001 a	0,0459 ± 0,004 a
Leu	0,0828 ± 0,010 a	0,0620 ± 0,001 a	0,0912 ± 0,015 a
Lys	2,1465 ± 0,079 a	1,7368 ± 0,064 b	2,2154 ± 0,196 a
SOMA	171,6533	231,3679	499,5767

I50 = 47,67 μM; I80 = 190 μM. Asp: aspartato; Glu: glutamato; Asn: asparagina; Ser: serina; Gln+His: glutamina + histidina; Arg: arginina; Gly: glicina; Thr: treonina; Ala: alanina; Tyr: tirosina; Met: metionina; Val: valina; Phe: fenilalanina; Ili: isoleucina; Leu: leucina e Lys: lisina. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste t à 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na Tabela 1, a interferência na concentração de aminoácidos causada pela presença do AMC foi variável de acordo com a concentração utilizada (47,67 μM ou 190 μM) e com o aminoácido em análise. Independentemente deste resultado, a asparagina (Asn) se mostrou o principal aminoácido presente nas raízes de *E. heterophylla*, representando mais de 90% do total de aminoácidos. A concentração de AMC necessária para inibir o crescimento radicular em 50% (I50) aumentou a concentração dos 7 aminoácidos seguintes: Asp, Glu, Gln+His, Thr, Tyr, Val e Ile. No tratamento I80, o aumento de teor foi observado para 12 aminoácidos: Asp, Glu, Asn, Ser, Gln+His, Arg, Gly, Thr, Ala, Tyr, Val e Ile. Os aminoácidos não afetados pelos tratamentos foram Met, Phe e Leu. O I50 reduziu em aproximadamente 20% o teor de Lys, embora o I80 não tenha alterado significativamente a concentração desse aminoácido.

A determinação de aminoácidos parece ser uma variável pouco analisada no estudo de químicos naturais com efeito fitotóxico, porém o acúmulo de aminoácidos constitui uma resposta fisiológica comum em casos de estresse abióticos causado por exemplo, pelo frio (USADEL et al., 2008), salinidade (LUGAN et al., 2010) e temperatura (KAPLAN et al., 2004). Esta elevação de teor pode estar associada a uma sinalização induzida pelo estresse para aumento da síntese ou da degradação de proteínas (KRASENSKY & JONAK, 2012). Além disso, o acúmulo de aminoácidos em condições de estresse pode também ser indicativo de dano celular (ROESSNER et al., 2006; WIDODO et al., 2009). No presente estudo, parece pouco provável que o AMC atue na inibição da síntese de aminoácidos, tanto ramificados, como aromáticos ou da glutamina, pois, ao invés de redução, houve acúmulo destes metabólitos. No entanto, a redução do crescimento longitudinal das raízes de *E. heterophylla* expostas ao AMC pode ser correlacionada com o número e com o teor dos aminoácidos afetados pelos tratamentos. Quanto maior a dose de AMC utilizada, maior foi o número de aminoácidos afetados e maiores os teores destes, em relação ao controle.

A integridade das células da região apical radicular foi avaliada por meio de testes de viabilidade celular, cujo resultado pode indicar dano celular. A viabilidade celular foi determinada quantitativamente e qualitativamente pelo método de coloração por azul de Evans e por microscopia de fluorescência, respectivamente. A coloração por azul de Evans está baseada na integridade física da membrana, ou seja, células viáveis não absorvem o corante (JACYN BAKER & MOCK, 1994). Desta forma, quanto maior a absorção do corante, menor a viabilidade celular. Já, o método qualitativo de determinação da viabilidade celular faz uso dos corantes diacetato de fluoresceína e iodeto de propídeo. A coloração com diacetato de fluoresceína indica a atividade de esterases nas células viáveis (HUANG et al., 1986). Este reagente, ao atravessar a membrana plasmática, é hidrolisado no citoplasma, emitindo fluorescência na cor verde quando iluminado com luz azul. A indicação da perda de viabilidade celular se dá pelo iodeto de propídeo, que não ultrapassa a membrana plasmática íntegra, corando células danificadas ao reagir com fragmentos de DNA, emitindo fluorescência da cor vermelha ao ser exposto a luz verde (CASTRO-CONCHA et al., 2012).

A Figura 5 apresenta os resultados quantitativos para perda de viabilidade celular das raízes de *E. heterophylla*. Quando comparado com o respectivo controle, foi possível observar que o tratamento I80 reduziu a viabilidade dos ápices radiculares em aproximadamente 100%. Por outro lado, a viabilidade celular não foi significativamente

alterada pelo tratamento I50. A determinação da viabilidade em termos qualitativos corroborou com os resultados obtidos quantitativamente, sendo encontrada redução da viabilidade das células das raízes de *E. heterophylla* no tratamento I80 (Figura 6). A partir da intensidade das cores vermelha e verde foi possível estimar também as regiões afetadas, ou não, pelos tratamentos. No tratamento I80, a região apical e de alongamento celular parecem ser as zonas onde a perda de viabilidade celular foi mais acentuada, dado a uniformidade e intensidade da cor vermelha. Nos tratamentos controle e I50, a coloração verde predominou ao longo de todo o comprimento da raiz, sugerindo que as células se encontravam viáveis, exceto na região apical.

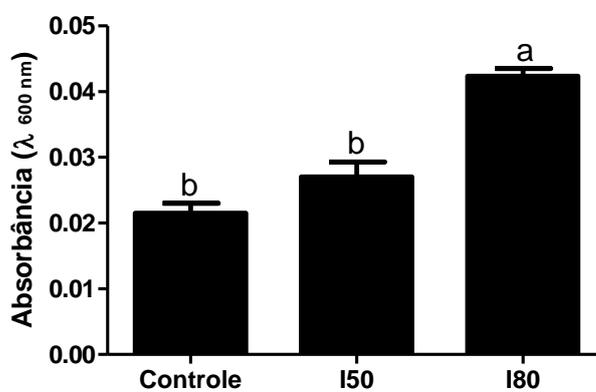


Figura 5. Perda de viabilidade em raízes de *E. heterophylla* nos diferentes tratamentos com o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

A perda de viabilidade celular, associada à drástica redução do crescimento longitudinal das raízes de *E. heterophylla*, sugere uma forte atividade alelopática para o AMC. O efeito fitotóxico promoveu aumento da concentração de aminoácidos, que pode estar correlacionado com a perda de viabilidade celular, o qual, por sua vez, indica dano celular.

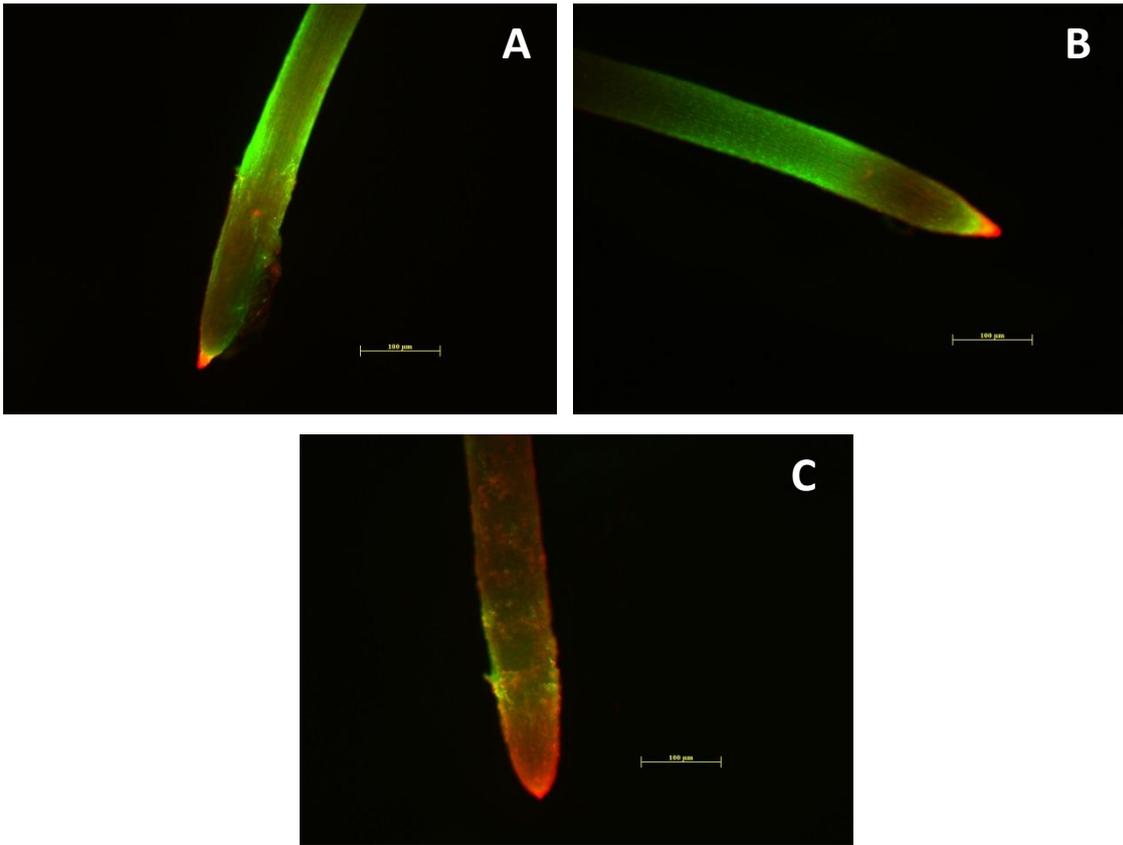


Figura 6. Viabilidade celular por meio do iodeto de propídio e acetato de fluoresceína em ápices radiculares de *E. heterophylla* tratadas ou não com o ácido *p*-metoxicinâmco. A: controle; B: (47,67 μM) e C: e (190 μM).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a fitotoxicidade do AMC nas raízes de *Euphorbia heterophylla*. A inibição do crescimento radicular pode estar associada a uma diminuição do índice mitótico e representar um dos possíveis mecanismos de ação deste composto. No entanto, a perda de viabilidade celular, para a maior concentração estudada, indica que possivelmente exista outro alvo primário de atuação do AMC. O acúmulo de aminoácidos livres, por sua vez, pode representar uma resposta ao estresse promovido pelo aleloquímico.

5. REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, M., LUPINI, A., OLIVIA, S., SORGONÀ, A. Allelochemical effects on net nitrate uptake and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize seedlings. **Biology Plant**, v. 54, p. 149-153, 2010.
- BARKOSKY, R. R., EINHELLIG, F. F., BUTLER, J. L. Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurge (*Euphorbia esula*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 286, p. 297-305, 2000.
- BIELESKI, R. L., TURNER, A. A separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-293, 1996.
- BROWN, S. T. Biosynthesis of Coumarins. In: BILLEK, G. (Ed.). **Biosynthesis of Aromatic compounds. Proceedings of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies**. v.1, cap. 2, Vienna: Pergamon, 1965. p.15-20.
- BUBNA, G. A., LIMA, R. G., ZANARDO, D. Y. R., SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1627-1633, 2011.
- CASTRO-CONCHA, L.; ESCOBEDO, R.; DE LOURDES MIRANDA-HAM, M. Measurement of Cell Viability. In: LOYOLA-VARGAS, V. M. e OCHOA-ALEJO, N. (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols**: Humana Press, v.877, 2012. cap. 5, p.49-56. (Methods in Molecular Biology).
- DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2079-2094, 2000.
- DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, 2006.
- FERRO, A. P. M., R.; SIQUEIRA-SOARES, R.C.; BONINI, E. A.; FERRARESE, M. L. L.; FERRARESE-FILHO, O. Effects of cinnamic and ferulic acid on growth and lignification of maize roots. **Journal of Allelochemical Interactions**, v. 1, p. 29-38, 2015.
- HUANG, C., N., CORNEJO, M., BUSH, D. JONES, R. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, p. 80-87, 1986.
- HUDSON, E. A., DINH, P. A., KOKUBURN, T., SIMMONDS, M. S. J., GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 1163-1170, 2000.

JACYN BAKER, C.; MOCK, N. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, n. 1, p. 7-12, 1994.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry (principles and practice)**. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 1962, 408 p.

KAPLAN, F., KOPKA, J., HASKELL, D. W., ZHAO, W., SCHILLER, K. C., GATZKE N, SUNG, D. Y., GUY, C. L. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4159-4168, 2004.

KIM, S. R., SUNG, S. H., JANG, Y. P., MARKELONIS, G. J., OH, T. H., KIM, Y. C. E-p-methoxycinnamic acid protects cultured neuronal cells against neurotoxicity induced by glutamate. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1281-1291, 2002.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

LEE, S. R., KIM, K.J., KIM, Y.C. Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl₄ induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. **Planta Medica**, v. 68, p. 407-441, 2002.

LIMA, R. B., SALVADOR, V. H., SANTOS, W. D., BUBNA, G. A., FINGER-TEIXEIRA, A., SOARES, A. R., MARCHIOSI, R., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Enhanced Lignin Monomer Production Caused by Cinnamic Acid and Its Hydroxylated Derivatives Inhibits Soybean Root Growth. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e80542, 2013.

LUBER, J., PALMIERI, M. J., BOTELHO, C. M., RINALDO, D., ANDRADE-VIEIRA, L. F. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Lactuca sativa*. **Annals of the Brazilian Academy of Science**, v 2, n 87, p 903-913, 2015.

LUGAN, R., NIOGRET, M. F., LEPORT, L., GUÉGAN, J.P., LARHER, F.R., SAVOURÉ, A., KOPKA, J., BOUCHEREAU, A. Metabolome and water homeostasis analysis is a key response to osmotic stress in this halophyte. **The Plant Journal**, v. 64, p. 215-229, 2010.

MAHAJAN, R., KAUR, D. J., BAJAJ, K. L. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 20, p. 217-219, 1992.

MARUR, C. J., SODEK, L., MAGALHÃES, A. C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

OTHAMAN, R., IBRAHAIM, H., MOHD, A. M., MUSTAFA, M. R., AWANG, K. Biosay guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kampferia galangal* L. **Phytomedicine**, v. 13, p. 61-66, 2006.

- PARIZOTTO, A. V. BUBNA, G. A., MARCHIOSI, R., SOARES, A. R., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Benzoxazolin-2(3H)-one inhibits soybean growth and alters the monomeric composition of lignin. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 2, p. e989059, 2015.
- PERGO, É. M. ABRAHIM, D., SILVA, P. C. S., KERN, K. A., 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.
- PERGO, E. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Changes in Energy Metabolism and Antioxidant Defense Systems During Seed Germination of the Weed Species Ipomoea triloba L. and the Responses to Allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 5, p. 500-513, 2011.
- PIRES, N. M., SOUZA, I. R. P., PRATES, H. T., FARIA, T. C. L., FILHO, I. A. P., MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v 13, n 1, p 55-65, 2001.
- ROESSNER, U., PATTERSON, J.H., FORBES, M.G., FINCHER, G.B., LANGRIDGE, P., BACIC, A. An Investigation of Boron Toxicity in Barley Using Metabolomics. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1087-1101, 2006.
- SANTOS, V. H. M., DANELUZZI, G. S., SILVA, L. P., SILVA, R. M. G. Evaluation of allelopathic potencial of leaf extract of *Kielmeyera coriacea* on *Lactuca sativa* L. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p 259-267, 2015.
- SIVAGAMI, G., KARTHIKKUMAR V., BALASUBRAMANIAN .T, NALINI N.. The modulatory influence of p-methoxycinnamic acid, an active rice bran phenolic acid, against 1,2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 196, n. 1-2, p. 11-22, 2012.
- STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M. e HARBONE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. San Diego/London: Academic Press, 1997. p.387-416.
- USADEL, B. BLÄSING OE, GIBON Y, POREE F, HÖHNE M, GÜNTER M, TRETHERWEY R, KAMLAGE B, POORTER H, STITT M. Multilevel genomic analysis of the response of transcript, enzyme activities and metabolites in Arabidopsis rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, p. 518-547, 2008.
- WEATHERLEY, P. E. Studies in relative turgidity and environmental factors. **New Phytology**, v. 50, p. 36:51, 1951.
- WIDODO, U., PATTERSON J. H., NEWBIGIN E., TESTER M., BACIC A., ROESSNER, U. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 14, p. 4089-4103, 2009.

YE, S. F., ZHOU, Y. H., SUN, Y., ZOU, L.Y., YU, J. Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots and promotes incidence of *Fusarium wilt*. **Environmental Experimental Botany**, v. 56, p. 255-262, 2006.

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

CAPÍTULO 2

Ácido *p*-metoxicinâmico na lignificação de raízes de plântulas de
Euphorbia heterophylla

Ácido *p*-metoxicinâmico na lignificação de raízes de plântulas de *Euphorbia heterophylla*

RESUMO

O efeito alelopático do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) foi avaliado na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL), na peroxidase ligada a parede celular (POD), no conteúdo e composição monomérica da lignina, no teor de ácido ferúlico (AF) e ácido *p*-cumárico (AC) em raízes de plântulas de *Euphorbia heterophylla*. Foi avaliado ainda a concentração de AMC esterificado à parede celular. Plântulas de 5 dias foram cultivadas em sistema hidropônico durante 48 h em sala de crescimento, com fotoperíodo de 14 h e temperatura de 30°C dia / 22°C noite. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 3 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram: 47,67 µM, 190 µM que correspondem as concentrações de inibição de crescimento radicular de 50 e 80%, respectivamente, além do tratamento controle sem o ácido. Os resultados obtidos sugerem que o AMC possivelmente afetou o processo de lignificação, favorecendo o acúmulo de AF, AC e incorporação do AMC na parede celular. A ativação da POD pode sugerir sua participação na esterificação daqueles compostos na parede. A concentração dos monômeros não foi afetada e apenas a I80 aumentou a atividade da PAL e o teor de lignina.

Palavras-chave: Lignina. Planta daninha. Fenilalanina amônia-liase. Peroxidase ligada a parede celular.

ABSTRACT

The allelopathic effect of *p*-methoxycinnamic acid (MCA) was tested on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cell wall peroxidase (POD) activities, lignin content and its monomeric composition, ferulic acid (FA) and *p*-coumaric acid (CA) of *Euphorbia heterophylla* roots as well as MCA content. Five-day-old seedlings were cultivated in nutrient solution for 48 h in a growth chamber, photoperiod of 14 h and 30 °C light/22 °C dark. The experimental design was a completely randomized design, 3 treatments with at least 4 replicates each. The treatments were 47.67 µM, 190 µM, corresponding inhibition concentrations of root growth at 50 and 80%, respectively, plus the control treatment without acid. The results suggest that MCA affects the lignification process and promoted AF and AC accumulation and MCA incorporation into cell wall. POD activation could suggest its participation on AF, AC and MCA esterification process. Monomer composition was not affected by treatments and only 190 µM increased PAL activity and lignin content.

Keywords: Lignin. Weed. Phenylalanine ammonia-lyase. Cell wall peroxidase.

1. INTRODUÇÃO

Aleloquímicos são produzidos por vegetais superiores e desempenham um importante papel na comunicação química planta-planta, planta-micro-organismo, planta-inseto e, também, na autoproteção contra interferentes do meio (WEIR et al., 2004). Sejam eles isolados, coletados a partir de exudados e extratos, ou mesmo sintetizados em laboratório, podem causar efeitos fitotóxicos diversos, alterando processos fisiológicos como a respiração, utilização de água, eficiência fotossintética, absorção de nutrientes, síntese de ATP, metabolismo do fitocromo e expressão de genes (INDERJIT, 2003; BLUM & GERIG, 2005). O desenvolvimento de ferramentas analíticas nas áreas de fisiologia vegetal, biologia molecular e bioquímica tem contribuído expressivamente nos estudos sobre os mecanismos de ação dos aleloquímicos, muito embora, isso represente, ainda, uma incógnita para os estudos de alelopatia, devido a multiplicidade de alvos moleculares possíveis para estes compostos.

Grande parte dos aleloquímicos é liberada no solo e as raízes das plantas vizinhas são os primeiros sítios de contato com estes compostos. Devido a alta atividade metabólica dos tecidos radiculares, as raízes são particularmente suscetíveis ao estresse causado pelos aleloquímicos. A parede celular é um dos primeiros sítios afetados pelos sinais de estresse, que são transmitidos para o interior da célula, afetando várias vias metabólicas (KOMATSU et al., 2010). Dentre os processos de formação da parede celular, a deposição da lignina representa uma etapa crucial do crescimento radicular. Estudos indicam que a redução do crescimento radicular, causada por aleloquímicos, está relacionada com a lignificação prematura das paredes celulares (SANTOS et al., 2008; BUBNA et al., 2011). A lignina é o segundo polímero mais abundante da natureza, que interpenetrando as fibrilas de celulose garante a integridade estrutural, rigidez e resistência da parede celular (VANHOLME et al., 2010). A via de síntese da lignina é a mesma que dá origem a vários outros compostos secundários, como flavonoides, cumarinas, taninos e cutina. A primeira reação desta via é a desaminação do aminoácido fenilalanina catalisada pela fenilalanina amônia-liase (PAL), que resulta na formação do ácido *t*-cinâmico. Na sequência, ocorre uma hidroxilação no anel aromático, catalisada pela cinamato 4-hidroxilase (C4H), para gerar *p*-cumarato. Na etapa seguinte, ocorre a ativação do ácido à tioéster via hidroxicinamoil-CoA ligase (4-CL), formando *p*-cumaroil-CoA. Este composto é, então, transesterificado pela chiquimato/quinato 4-hidroxicinamoil-CoA 4-hidroxicinamoil transferase (HCT). A

reação de hidroxilação de *p*-cumaroil-CoA chiquimato/quinato produz cafeoil-CoA, é transesterificada novamente pela HCT, gerando o cafeoil-CoA. A reação de metoxilação catalisada pela cafeoil-CoA *o*-metiltransferase (CCoAOMT) gera cafeoil-CoA, a partir de feruloil-CoA. Nas etapas subsequentes pela ação da cinamoil-CoA redutase (CCR), ferulato 5-hidroxilase (F5H), ácido cafeico 3-*O*-metiltransferase (COMT) e cinamil álcool desidrogenase (CAD), CoA teioesters são convertidos à monolignóis (álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Na etapa final da via dos fenilpropanoides, peroxidases (POD) catalisam a polimerização oxidativa dos três alcoóis para gerar as unidades monoméricas do polímero lignina: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (VANHOLME et al., 2010; VOGT 2010).

Os termos “*core*” e “*não core*” têm sido utilizados para diferenciar tipos de lignina (JUNG & DEETZ, 1993; LAPIERRE; 1993). A lignina *core* corresponde as unidades H, G e S que são altamente condensadas e muito resistentes à degradação. A lignina *não core* é representada pelos compostos de baixo peso molecular liberados da parede por hidrólise, representados pelos ácidos *p*-cumárico (AC), ferúlico (AF) e seus oligômeros. Estes ácidos fenólicos podem estar ligados à lignina *core*, aos polissacarídeos da parede ou a ambos, concomitantemente (JUNG, 1989).

Estudos recentes demonstraram que a aplicação exógena do aleloquímico ácido cinâmico e seus derivados hidroxilados promovem a inibição do crescimento radicular de plantas de soja (LIMA et al., 2013; SALVADOR et al., 2013). Segundo estes autores, essa resposta pode estar vinculada a um enrijecimento da parede celular, uma vez que os aleloquímicos aumentaram o teor de lignina e seus principais monômeros. Com base nestes resultados, foi proposto um modelo para o mecanismo de ação dos ácidos fenólicos nas plantas. Após absorvidos, esses compostos seriam diretamente canalizados para a via dos fenilpropanoides, induzindo a produção de lignina. A redução do crescimento das raízes de plantas expostas aos ácidos fenólicos seria, portanto, uma consequência do enrijecimento da parede celular, causada pela produção exacerbada de lignina (dos SANTOS et al., 2008; ZANARDO et al., 2009; BUBNA et al., 2011; LIMA et al., 2013). Outros estudos, porém, têm sugerido que a redução do crescimento radicular e aumento do teor de lignina são consequências do processo de defesa da planta contra o estresse provocado pelos aleloquímicos (BÖHM et al., 2006; SOARES et al., 2012; SIQUEIRA-SOARES et al., 2013).

A maior parte dos estudos realizados no campo da alelopatia fazem uso de plantas cultivadas como planta modelo, sendo escassos os trabalhos que procuraram identificar

efeitos alelopáticos sobre plantas daninhas. Tendo em vista o fato de as plantas daninhas representarem uma ameaça à produtividade dos sistemas agrícolas mundiais e a sua crescente dificuldade de manejo, a identificação de compostos que influenciem negativamente o crescimento dessas plantas parece excepcionalmente pertinente. Neste contexto, *Euphorbia heterophylla* se destaca como uma das principais espécies infestantes da cultura da soja no Brasil, apresentando resistência múltipla aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) e protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (TREZZI et al., 2005). Assim, este estudo teve por objetivo investigar os efeitos alelopáticos do AMC sobre raízes de *Euphorbia heterophylla*, avaliando, principalmente, a atividade de enzimas relacionadas à via de lignificação (PAL e POD), o teor e a composição monomérica da lignina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo e tratamento das plantas de *Euphorbia heterophylla*

Ensaio de dose-resposta foram conduzidos com plântulas de *E. heterophylla* para determinar as concentrações de AMC necessárias para inibir o crescimento radicular em 50% (I50) e 80% (I80), concentrações estas utilizadas em todos os experimentos deste estudo. Para obtenção das plântulas, sementes de *E. heterophylla* foram colocadas para germinar e, após 5 dias, as plântulas foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva pH 6,0 (DONG et al., 2006). Os tratamentos foram adicionados à solução nutritiva, sendo eles 47,67 μM (I50) e 190 μM (I80) de AMC, mais o controle (ausência do ácido). Os recipientes contendo as plântulas foram acondicionados em sala de cultivo, onde permaneceram por 48 h sob fotoperíodo de 14 h e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento.

2.2 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

Raízes frescas foram pesadas em balança digital e maceradas em nitrogênio líquido. Adicionou-se tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo 1mM de EDTA e 3 mM de DTT e 4% de PVP (p/v) com volume 1,5 vezes o peso de massa obtido. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante (extrato enzimático) coletado e armazenado em freezer à -80°C até análise (AZEVEDO et al., 1998). Então, 0,250 mL do extrato enzimático e 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,7) foram incubados em banho-maria a 40°C por 5 min. A reação foi iniciada pela adição de 0,3 mL de L-fenilalanina 50 mM. Após 1 h a reação foi interrompida pela adição de 50 μL de HCl 5,0 M (FERRARESE et al., 2000).

As amostras foram apropriadamente diluídas e filtradas em filtro de 0,45 μm acoplado a uma seringa descartável antes da análise cromatográfica. Amostras (20 μL) foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), equipado com bomba LC-10AD, injetor Rheodine[®], detector UV SPD-10A, módulo de comunicação CBM-101 e estação de trabalho Class-CR10. Uma coluna de fase reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (150 x 4,6 mm, 5 μm) foi utilizada a temperatura de 30°C , juntamente

com uma pré-coluna (10 x 4,6 mm) equivalente. Uma mistura de metanol:água (70:30), aplicada com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹, foi utilizada como fase móvel. A absorção foi mensurada a 275 nm, um comprimento de onda que foi previamente determinado através de um espectro de absorção de um padrão de ácido *t*-cinâmico dissolvido em fase móvel. A coleta dos dados e a integração da área dos picos foram realizadas por meio do software Class-CR10 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). O produto da reação, o ácido *t*-cinâmico, foi identificado por comparação do seu tempo de retenção com aquele de um padrão 10 µM. A atividade da PAL foi expressa em nmol *t*-cinamato h⁻¹ mg⁻¹ de proteínas.

2.3 Determinação do teor e da composição monomérica da lignina

2.3.1 Obtenção da parede celular

Raízes secas (0,3 g) foram homogeneizadas em 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL (FERRARESE et al., 2002). O material foi centrifugado (1400g, 5 min) e lavado por sucessiva agitação e centrifugação como segue: 2 x com 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0); 3x com Triton[®] 1% (v/v) preparado em tampão fosfato (pH 7,0); 2x com 7,0 mL de NaCl 1,0 M também em tampão (pH 7,0); 2x com 7,0 mL de água destilada; e 2x com 5,0 mL de acetona. O precipitado foi seco em estufa (60°C, 24 h) e resfriado em dessecador a vácuo. A massa seca foi definida como a fração da parede celular isenta de proteínas.

2.3.2 Determinação do teor de lignina

Amostras (20 mg) de parede celular isenta de proteínas foram adicionadas a tubos de vidro com rosca contendo 0,5 mL do reagente brometo de acetila 25% (preparado em ácido acético glacial gelado). Os frascos foram aquecidos por 30 min em banho-maria a 70°C. Após este procedimento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a reação interrompida pela adição de 0,9 mL de NaOH 2,0 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 4 mL de ácido acético glacial gelado. As amostras foram centrifugadas (1000g, 5 min) e o sobrenadante diluído e utilizado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração

de lignina foi determinada, de acordo com uma curva padrão e expressa em mg g^{-1} de parede celular (MOREIRA-VILAR et al., 2014).

2.3.3 Determinação da composição monomérica da lignina

Para determinar a composição monomérica da lignina, foi usada a oxidação com nitrobenzeno (DEAN, 1997). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi colocada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1 mL de NaOH 2 M e 100 μL de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para análise isocrática de 20 min. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como mg do monômero g^{-1} de parede celular.

2.4 Determinação da atividade da peroxidase ligada à parede celular (EC 1.11. 1.7)

A atividade da peroxidase (POD) ligada à parede celular foi determinada pelo método de oxidação do guaiacol (dos SANTOS et al., 2004). Raízes frescas foram pesadas (0,5 g) e maceradas em gral gelado contendo 5,0 mL tampão fosfato 67 mM (pH 7,0) e 0,1 g de PVP (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 3300 rpm por 5 min a 4°C . O sobrenadante obtido foi descartado e o pellet lavado com água deionizada até a não detecção da atividade da POD solúvel no sobrenadante. A extração da peroxidase ligada à parede celular foi alcançada incubando-se o pellet em 2 mL de NaCl 1,0 M por 1 h a 4°C . Após este período, o homogeneizado foi centrifugado a 3300 rpm por 5 min e o sobrenadante considerado como extrato enzimático. A atividade da enzima foi determinada em meio de reação (1,5 mL) contendo tampão fosfato 25 mM (pH 6,8), guaiacol 2,56 mM e H_2O_2 10 mM. A reação foi iniciada adicionando-se o extrato enzimático apropriadamente diluído ao meio reativo. A oxidação do guaiacol foi seguida por 5 min a 470 nm em espectrofotômetro e a atividade enzimática calculada

utilizando coeficiente de extinção ($25,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do tetraguaiacol. A atividade da POD ligada foi expressa em μmol de tetraguaiacol $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.5 Determinação do teor de proteína total

Os teores de proteínas nos extratos enzimáticos foram determinados de acordo com Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

2.6 Determinação dos ácidos *p*-metoxicinâmico, *p*-cumárico e ferúlico ligados à parede celular

Os ácidos *p*-metoxicinâmico (AMC), *p*-cumárico e ferúlico esterificados à parede celular foram extraídos por hidrólise alcalina. A biomassa seca das raízes (50 mg) foi homogeneizada com metanol 50% (v/v) e incubada a 80°C por 90 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas (3200 rpm, 4°C , 15 min) o sobrenadante descartado e o precipitado lavado duas vezes com metanol 50% (v/v). O precipitado foi seco a 60°C por 24 h. Logo após, o material foi ressuscitado em 2,5 mL de NaOH 0,5 M e incubado à 96°C por 2 h. Nestas condições brandas de saponificação, os ácidos *p*-metoxicinâmico, *p*-cumárico e ferúlico ligados à parede celular por ligação do tipo éster são liberados na solução. O sobrenadante obtido foi acidificado à pH 2,0 com HCl 6 M e, então, centrifugado sob refrigeração (4°C) a 320 rpm por 15 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante acondicionado em balão de separação. Para a coleta dos ácidos esterificados foi adicionando éter etílico (2x) naquelas amostras e, após completa separação das fases, a fração etérea foi seca em rotaevaporador à 40°C .

As amostras foram ressuscitadas em 4% de metanol/ácido acético (30/70, v/v), filtradas em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ acoplado a uma seringa descartável e analisados em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), equipado com bomba LC-10AD, injetor Rheodine[®], detector UV-VIS SPD-10A, módulo de comunicação CBM-101. Uma coluna (C18) de fase reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) foi utilizada a temperatura de 30°C , juntamente com uma pré-coluna (10 x 4,6 mm) equivalente. A separação dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico foi realizada com metanol/ácido acético (30/70, v/v). A fase móvel utilizada para o AMC foi metanol/ácido acético 4% (60/70, v/v). O fluxo foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, modo isocrático. A absorção foi mensurada a 322 nm para o ácido ferúlico e 309 nm para os ácidos *p*-

cumárico e *p*-metoxicinâmico. A quantificação dos ácidos foi realizada de acordo com curva padrão correspondente para cada composto. Os valores foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa seca para os ácidos ferúlico e *p*-cumárico e mg g^{-1} de biomassa seca para o AMC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento e o desenvolvimento vegetal são significativamente influenciados pela presença de aleloquímicos (WEIR et al., 2004), principalmente em estádios juvenis. A inibição do comprimento e das biomassas fresca e seca das raízes pode confirmar a vulnerabilidade das plantas à ação de um agente alelopático. Em estudos anteriores, foi demonstrado que as concentrações de AMC necessárias para inibir o crescimento longitudinal das raízes de *E. heterophylla* em 50 (I50) e 80% (I80) foram, respectivamente, 47,67 e 190 μM . Neste trabalho, as mesmas doses foram utilizadas para avaliar o efeito deste aleloquímico na atividade da PAL, teor de lignina e seus monômeros, concentração dos ácidos ferúlico, cumárico e AMC, além da peroxidase ligada a parede celular.

Como pode ser observado na Figura 1, a I80 estimulou a atividade da PAL em aproximadamente 81% ($115,13 \pm 12,0$ nmol *t*-cinamato $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), enquanto que nenhuma alteração foi encontrada no tratamento I50, comparado ao controle. Os efeitos na atividade da PAL causados pela presença de aleloquímicos parecem ser contraditórios, pois ora estimulam (dos SANTOS et al., 2004), ora inibem (BUBNA et al., 2011; FERRO et al., 2015) ou mesmo não afetam sua atividade (SHAN & BLUM, 1987). Por esses motivos, alguns autores defendem que o impacto da PAL na biossíntese de lignina pode não ser crucial (ANTEROLA, 2002). No entanto, no presente estudo, a concentração do AMC que reduziu o crescimento longitudinal das raízes em 80% e aumentou a atividade da PAL também incrementou o teor de lignina em 11%, ($108,83 \pm 1,77$ mg g^{-1} parede celular, Figura 2), sugerindo uma possível relação direta entre a atividade da PAL e o polímero. Em contrapartida, a exposição das plantas de *E. heterophylla* ao AMC não resultou em alterações significativas na composição monomérica da lignina das raízes (Figura 3).

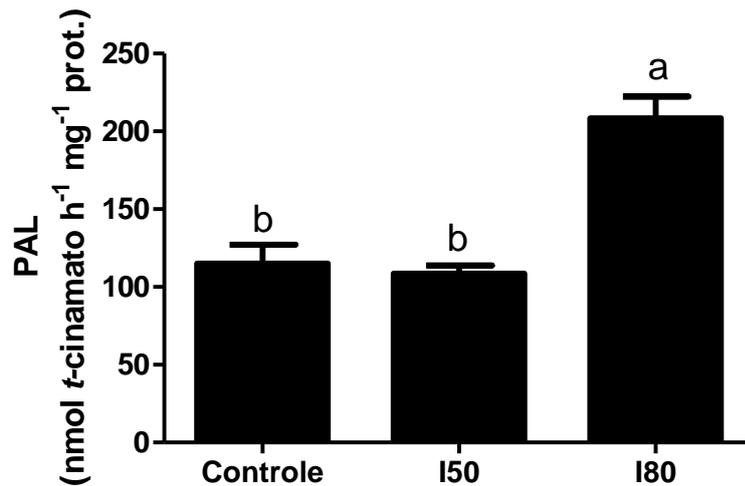


Figura 1. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) de raízes de *E. heterophylla* tratadas com ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 6 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t à 5% de probabilidade.

É estabelecido, desde há muito tempo, que a lignina é formada principalmente pelos monômeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) cujas concentrações variam de acordo com a espécie vegetal, com o tecido e com a localização na parede celular. Todavia, a essas unidades principais, monômeros não convencionais podem ser formados a partir de *p*-cumarato, acetato de sinapil, álcoois hidroxicinamil acetilados, *p*-hidroxibenzoatos, álcoois diidroxiconiferil e ferulatos, que, por sua vez, são polimerizados à lignina (SEDEROFF et al., 1999; VANHOLME et al., 2012). Além disso, dependendo das condições, as plantas simplesmente requerem um polímero com propriedades específicas e sua composição usual (H, G, S) torna-se irrelevante (RALPH et al., 1997). Com base nesses argumentos e nos resultados obtidos, é possível sugerir que o AMC tenha interferido na via dos fenilpropanoides, ativando a PAL e a polimerização de outros compostos, que resultou no aumento do teor de lignina. Para confirmar esta suposição, a atividade da POD ligada à parede celular mais a concentração do AMC, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico foram determinados nas plantas de *E. heterophylla* expostas ao aleloquímico.

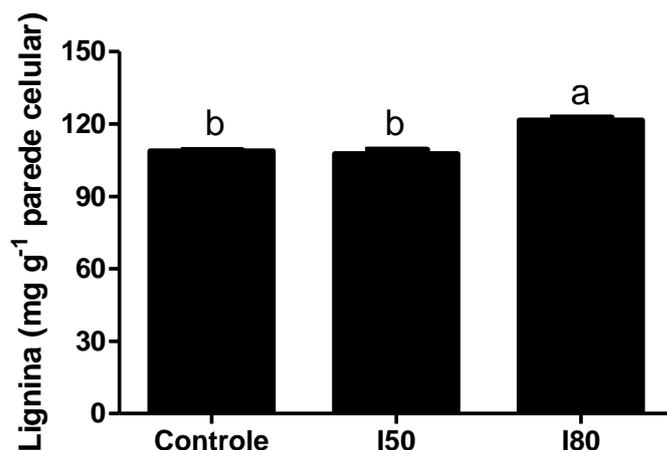


Figura 2. Teor de lignina de raízes de *E. heterophylla* tratadas com ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t à 5% de probabilidade.

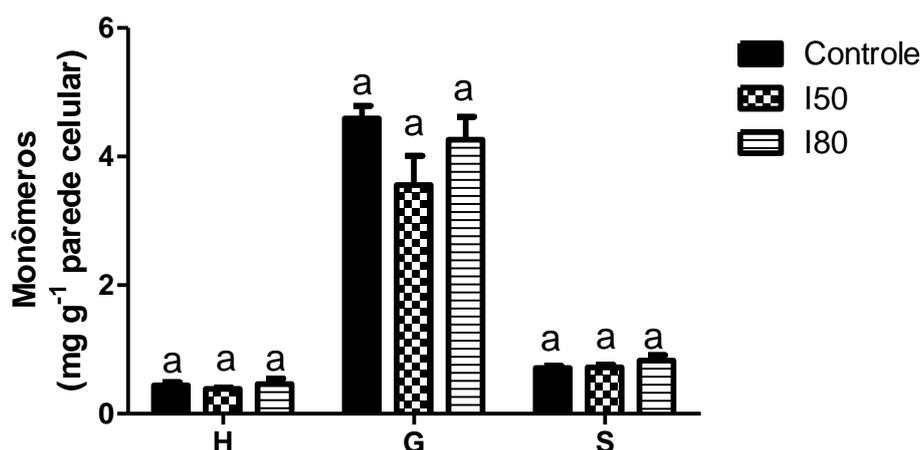


Figura 3. Composição monomérica da lignina de raízes de *E. heterophylla* tratadas com o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50= 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. H: *p*-hidroxibenzaldeído, G: guaiacil e S: siringil. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t à 5% de probabilidade.

Pode ser observado na Figura 4 que a atividade da POD, tanto em I50 quanto I80 apresentou aumento significativo em relação as plantas controle, com valores duas vezes maiores que estas ($171,00 \pm 10,9 \mu\text{mol de tetraguaiacol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína). POD são enzimas oxirredutoras que podem estar ligadas ionicamente à parede celular e participam da etapa final da síntese de lignina, convertendo cinamil álcoóis e outros compostos fenólicos a radicais fenóxidos, utilizando como substrato H_2O_2 . Estes radicais formados se polimerizam, gerando complexas ligações entre proteínas, ligninas

e polissacarídeos (ALMAGRO et al., 2009). A análise de POD ligadas a parede é uma variável comum nos estudos dos efeitos de aleloquímicos no processo de lignificação das plantas (ZANARDO et al., 2009; BUBNA et al., 2011; SIQUEIRA-SOARES et al., 2013). Em alguns destes estudos, a ativação de enzimas da via dos fenilpropanoides, como POD e PAL, pode estar associada a um incremento no teor de lignina, que tornaria a parede celular mais rígida e, desta forma, inibiria o crescimento das raízes (dos SANTOS et al., 2004; SOARES et al., 2012). No presente estudo, o AMC na I80 ativou a PAL, a POD e alterou o conteúdo de total de lignina e, embora não tenham sido observadas alterações da PAL e do teor de lignina, o tratamento I50 afetou significativamente a atividade da POD. Isto sugere uma possível interferência do AMC no processo de lignificação, ou mesmo, na composição da parede celular das raízes de *E. heterophylla*.

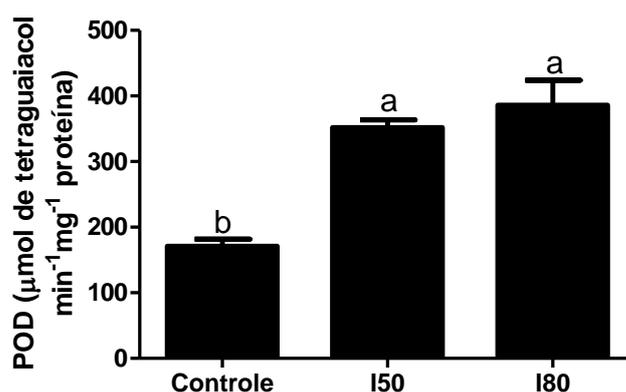


Figura 4. Atividade da peroxidase (POD) ligada à parede celular de raízes de *E. heterophylla* tratadas com o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μM; I80 = 190 μM. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

A parede celular é composta principalmente por celulose, hemiceluloses, lignina, pectina, proteínas e compostos aromáticos (MATIAS et al., 2014). Ela dá forma às células, confere resistência mecânica aos tecidos, controla a expansão celular, atua sobre o transporte intercelular e participa de processos de sinalização, reconhecimento e proteção contra patógenos. Os polímeros formadores da parede celular constituem basicamente três domínios (celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas) com funções distintas. O domínio celulose-hemicelulose determina a forma celular, enquanto que o domínio péctico a porosidade da parede. As proteínas têm papel estrutural e enzimático.

Sintetizado na via dos fenilpropanoides, o ácido ferúlico (AF) é um ácido fenólico que desempenha importantes funções fisiológicas. No interior da parede celular, ele é hábil por acoplar oxidativamente com outras moléculas de AF, com seus derivados, com a lignina e com proteínas estruturais (CARPITA et al. 2001; MATIAS et al. 2014). O grupo carboxílico localizado na extremidade de sua cadeia propenil provê a habilidade de esterificar hemiceluloses. Dessa forma, o AF pode se ligar covalentemente à lignina e às proteínas da parede celular por ligações do tipo éter e com os polissacarídeos por ligações do tipo éster, atuando como um conector universal entre polímeros da parede celular. Portanto, o AF desempenha um papel chave na cessação do crescimento celular, ancorando a lignina nos polissacarídeos da parede (MATIAS et al. 2014). Devido à similaridade estrutural com o AF, supomos que o AMC possa também realizar ligações cruzadas entre polímeros da parede celular e limitar o crescimento das plantas. Para verificar a possível incorporação do AMC na parede celular vegetal, foi realizada a hidrólise alcalina da parede celular com sua posterior identificação e quantificação cromatográfica. A quantificação de AF e ácido *p*-cumárico também foi realizada.

O AMC não foi identificado no hidrolisado de parede celular de raízes de plantas controle. Porém, o AMC foi encontrado em parede celular de raízes de plantas de *E. heterophylla* expostas a este aleloquímico (Fig. 5). A quantidade de AMC no I50 totaliza $0,56 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$ de biomassa e para I80, $1,11 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$ de biomassa, ou seja, a deposição do ácido ocorreu de forma crescente com o aumento da concentração do aleloquímico. Assim, o AMC aplicado exogenamente parece ser absorvido pelas raízes e esterificado à parede celular.

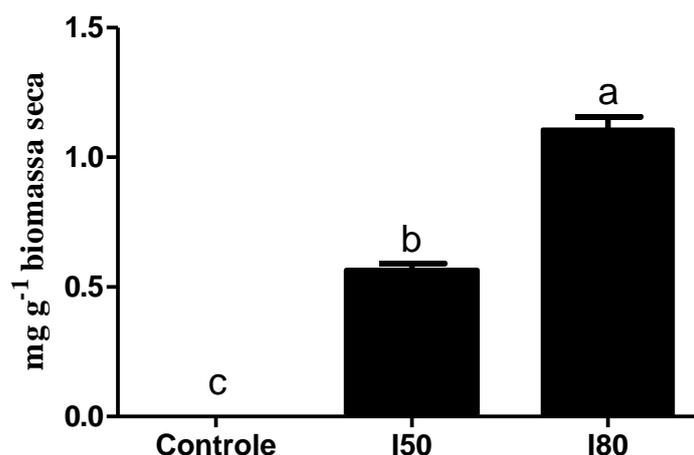


Figura 5. Teor de ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) esterificado à parede celular de raízes de *E. heterophylla* expostas ao aleloquímico (I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M). Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

Dentre os compostos aromáticos, o AF e o AC desempenham um papel fundamental na arquitetura da parede celular. Também denominados de lignina *não core*, são compostos de baixo peso molecular liberados da parede por simples hidrólise, ao contrário das unidades H, G e S que são altamente resistentes à degradação química. A deposição de AF e AC tem sido relacionada com a diminuição do crescimento vegetal. A alongação de internódios de arroz irrigado é cessada após um aumento na deposição destes ácidos esterificados à parede (AZUMA et al., 2005). Além disso, o tratamento com AF em plântulas de soja e milho interrompe o crescimento longitudinal das raízes e aumenta o teor total de lignina (dos SANTOS et al., 2008; FERRO et al., 2015). Com base nessas referências, foi avaliada a concentração de AF e AC, tratadas ou não com o AMC, e os resultados apresentados na Figura 6.

O tratamento com o AMC nas raízes de *E. heterophylla* promoveu um aumento da concentração do ácido ferúlico, aproximadamente 2x maior no I50 e I80 comparado as plantas controle ($49,57 \pm 7,30 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca) (Figura 6). No entanto, não diferiram estatisticamente entre si os tratamentos I50 e I80. Para o ácido *p*-cumárico, o maior acúmulo ocorreu no I50 ($24,89 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca) seguido pelo I80 ($17,45 \pm 0,99 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca).

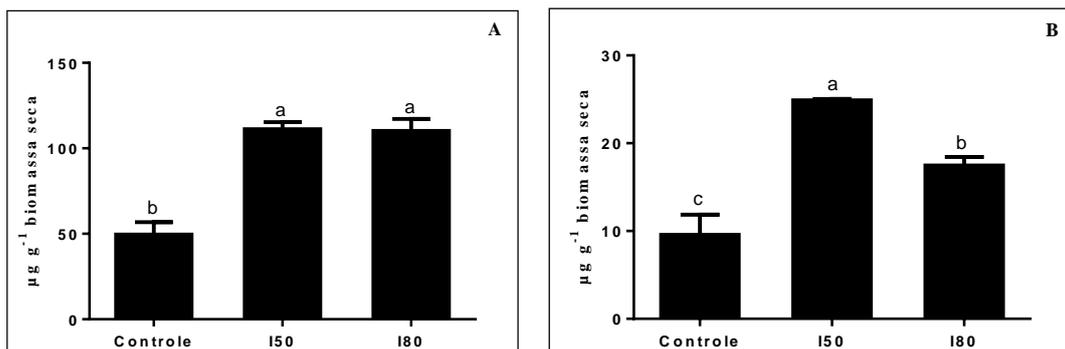


Figura 6. Teor do ácido ferúlico (A) e ácido *p*-cumárico (B) esterificado na parede celular de raízes de *E. heterophylla* tratadas com ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 µM; I80 = 190 µM. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t à 5% de probabilidade.

O aumento da concentração de AF e AC pode estar relacionado com a ativação da POD ligada à parede celular observada nas raízes das plantas tratadas com o AMC. Esta enzima tem a habilidade de converter compostos fenólicos aos radicais fenólicos, que, por sua vez, são polimerizados à lignina e/ou polissacarídeos, enrijecendo a parede celular. Pode-se sugerir, também, que este mesmo processo tenha ocorrido para a incorporação do AMC na parede celular, ou seja, houve participação direta das PODs no processo de esterificação tanto do AF e AC quanto do AMC junto à parede.

Com base nos resultados obtidos, a parede celular das raízes de *E. heterophylla* pode representar um dos possíveis sítios de ação do AMC. Apesar do aumento no teor total de lignina e atividade da PAL serem observadas apenas para o I80, os principais constituintes da lignina, os monômeros H, G e S não foram afetados pelos tratamentos com o AMC em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, houve acúmulo de AF e AC que podem estar ligados à lignina e aos polissacarídeos da parede. Foi possível observar também, que o próprio AMC é incorporado à parede celular e passa a ser um constituinte estrutural da célula vegetal. A ativação da POD e o incremento dos teores de AF, AC mais a deposição do AMC sugerem a participação desta enzima no processo de esterificação destes compostos na parede. Juntos, todos estes fatores podem ter contribuído para a diminuição do crescimento das raízes.

4. CONCLUSÕES

O processo de lignificação das raízes de *Euphorbia heterophylla* foi afetado pela presença do AMC. A esterificação de AMC, somada ao acúmulo de AF e AC, que compõe a lignina *não core*, pode ter alterado a flexibilidade da parede celular e contribuído para a redução do crescimento radicular das plantas. A incorporação do AMC na parede celular também sugere que este composto esteja estabelecendo ligações cruzadas entre os polímeros da parede. O incremento na atividade da POD, por sua vez, sugere que esta enzima está envolvida na reação de esterificação de AF, AC e AMC na parede. A concentração dos monômeros H, G e S não foi alterada pelo tratamento com o aleloquímico.

5. REFERÊNCIAS

ALMAGRO, L., GOMES ROS, L. V., BELCHI-NAVARRO, S., BRU, R., ROS BARCELÓ, A., PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.

AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. . Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**. v.104, p. 280-292, 1998.

AZUMA, T., OKITA, N., NANMORI, T., YASUDA, T. Relationship between the deposition of phenolic acids in the cell walls and the cessation of rapid growth in internodes of floating rice. **Plant Production Science**, v 8, p 447-453. 2005.

BLUM, U.; GERIG, T. M. Relationships between Phenolic Acid Concentrations, Transpiration, Water Utilization, Leaf Area Expansion, and Uptake of Phenolic Acids: Nutrient Culture Studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 8, p. 1907-1932, 2005.

BÖHM, P. A. F., ZANARDO, F. M. L., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase activity and lignification soybean root growth inhibition by juglone. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 315-317, 2006.

BUBNA, G. A., LIMA, R. G., ZANARDO, D. Y. R., SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1627-1633, 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification os microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytica Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARPITA, N., McCANN, M. The cell wall. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants** (BUCHANAN, B. and JONES, R., eds). Rockville, IL: American Society of Plant Physiologists. 2000.

CARPITA, N. C.; DEFERNEZ, M.; FINDLAY, K.; WELLS, B.; SHOUE, D. A.; CATCHPOLE, G.; WILSON, R. H., MCCANN, M. C. (2001) Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology*. 127, 551–565. ARPITA, N.C.; DEFERNEZ, M.; FINDLAY, K.; WELLS, B.; SHOUE, D.A.; CATCHPOLE, G.; WILSON, R.H. and MCCANN, M.C. (2001) Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. **Plant Physiology**. 127, 551–565.

DEAN J. F. D. Lignin analysis. In **Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Dashek WV (ed.). CRC Press: Boca Raton, 1997. 199-215 p.

DING, J., SUN, Y., XIAO, C. L., SHI, K., ZHOU, Y. H., YU, J. Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. **Journal Experimental Botany**, v 58, p 3756-3773. 2007.

DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, 2006.

dos SANTOS, W. D., FERRARESE, M.L.L., FINGER, A., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in Glycine maz root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 1203-1212, 2004.

dos SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., NAKAMURA, C. V., MOURÃO, K. S. M., MANGOLIN, C. A. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.

FERRARESE, M. L. L., RODRIGUES, J. D., FERRARESE-FILHO, O. . Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Plant Biology**, v. 2, p. 152-153, 2000.

FERRO, A. P. M., R.; SIQUEIRA-SOARES, R. C.; BONINI, E. A.; FERRARESE, M. L. L; FERRARESE-FILHO, O. Effects of cinnamic and ferulic acid on growth and lignification of maize roots. **Journal of Allelochemical Interactions**, v. 1, p. 29-38, 2015.

INDERJIT, DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.

JUNG, H. G., DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG H.G., BUXTON D.R., HATFIELD R.D. et al. (Ed.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: America Society of Agronomy, 1993. 315-346p.

JUNG H. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Journal of Agriculture**. v. 81, p. 33-38, 1989.

KOMATSU, S., KOBAYASHI Y., NISHIZAWA, K., NANJO, Y., FURUKAWA, K. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. **Amino Acids**, v. 39, n. 5, p. 1435-1449, 2010.

LAPIERRE C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG H.G., BUXTON D.R. HATFIELD, R.D., et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy, 1993. 133-163 p.

LIMA, R. B., SALVADOR, V. H., SANTOS, W. D., BUBNA, G. A., FINGER-TEIXEIRA, A., SOARES, A. R., MARCHIOSI, R., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Enhanced Lignin Monomer Production Caused by Cinnamic Acid and Its Hydroxylated Derivatives Inhibits Soybean Root Growth. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e80542, 2013.

MATIAS, D. M.; FINGER-TEIXEIRA, A.; MOTA, T. R.; SALVADOR, V. H.; MOREIRA-VILAR, F. C.; MOLINARI, H. B. C.; MITCHELL, R. A. C.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; dos SANTOS, W. D. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal** pp. 1-9 (2014).

MOREIRA-VILAR, F. C., SIQUEIRA-SOARES, R. C., FINGER-TEIXEIRA, A., OLIVEIRA, D. M., FERRO, A. P., ROCHA, G. J., FERRARESE, M. L. L., SANTOS, W. D., FERRARESE-FILHO, O. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-7, 2014.

ONNERUD, H. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. **Plant Cell**, v 14, p 1953-1962. 2002.

RALPH, J., MACKAY, J. J., HATFIELD, D., O'MALLEY, M., WHETTEN, R. W., SEDEROFF, R. R. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. **Science**, v. 277, p. 235-239, 1997.

SALVADOR, V. H., LIMA, R. B., SANTOS, W. D., SOARES, A. R., BÖHM, P. A. F., MARCHIOSI, R., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. **PLOS ONE**, v 8, n 7, p 1-10, 2013.

SANTOS, W. D., FERRARESE M. L., NAKAMURA C. V., MOURÃO, K. S., MANGOLIN, C. A., FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.

SEDEROFF, R. R., MACKAY, J. J., RALPH, J., HATFIELD, D. Unexpected variation in lignin. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 145-152, 1999.

SHAN, J. R., BLUM, U. The utilization of exogenously supplied ferulic acid in lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2977-2982, 1987.

SIQUEIRA-SOARES, R. D. C., SOARES, A. R., PARIZOTTO, A. V., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Root Growth and Enzymes Related to the Lignification of Maize Seedlings Exposed to the Allelochemical L-DOPA. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

SOARES, A. R., SIQUEIRA-SOARES, R. C., SALVADOR, V. H., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. The effects of l-DOPA on root growth, lignification and enzyme activity in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1811-1817, 2012.

TREZZI, M. M., FELIPPI, C.L., MATTEI, D., SILVA, H.L., NUNES, A.L., DEBASTIANI, C., VIDAL, R.A., MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health part B**, v. 40, p. 101-109, 2005.

VANHOLME, R. MORREEL K., DARRAH C., OYARCE P., GRABBER J. H., RALPH J., BOERJAN W. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. **New Phytologist**, v. 196, n. 4, p. 978-1000, 2012.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010. ISSN 16742052.

WEIR, T. L.; PARK, S.-W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 332, p. 681-692, 1997.

YU, J. Q., YE, S. F., ZHANG, M. F., HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 129-139. 2003.

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

CAPÍTULO 3

Respiração e atividade de enzimas antioxidantes em raízes de *Euphorbia heterophylla* na presença do ácido *p*-metoxicinâmico

Respiração e atividade de enzimas antioxidantes em raízes de *Euphorbia heterophylla*
na presença do ácido *p*-metoxicinâmico

RESUMO

O efeito alelopático do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) foi testado na atividade respiratória de ápices radiculares isolados, na atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, e também no teor de peróxido de hidrogênio em raízes de *Euphorbia heterophylla*. Plântulas de 5 dias foram cultivadas em sistema hidropônico durante 48 h em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 h e temperatura de 30°C dia / 22°C noite. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 3 tratamentos com 4 repetições. Os tratamentos foram: 47,67 µM, 190 µM que correspondem as concentrações de inibição de crescimento radicular de 50 e 80%, respectivamente, mais o tratamento controle sem o ácido. AMC promoveu um incremento da respiração extramitocondrial, favoreceu o acúmulo de peróxido de hidrogênio e ativou enzimas do metabolismo antioxidativo. A relação ATP/ADP foi significativamente reduzida em todos os tratamentos testados. Os resultados permitem concluir que o AMC promoveu um desequilíbrio no metabolismo normal das raízes de *E. heterophylla* provocando um estresse oxidativo e reduziu a carga energética celular.

Palavras-chave: Consumo de oxigênio. Planta daninha. Alelopatia. Catalase. Peroxidase.

Respiratory and antioxidant enzymes activity of *Euphorbia heterophylla* roots exposed to *p*-methoxycinnamic acid

ABSTRACT

The allelopathic effect of *p*-methoxycinnamic acid (MCA) was tested on respiratory activity of root tips, catalase, peroxidase and superoxide dismutase antioxidant enzymes activity, and hydrogen peroxide content of *Euphorbia heterophylla* roots. Five-day-old seedlings were cultivated in nutrient solution for 48 h in a growth chamber, photoperiod of 14 h and 30 °C light/22 °C dark. The experimental design was a completely randomized design, 3 treatments with at least 4 replicates each. The treatments were 47.67 µM, 190 µM, corresponding inhibition concentrations of root growth at 50 and 80%, respectively, plus the control treatment without acid. Root apex respiratory was also affected by MCA. The allelochemical increased the extramitochondrial respiration, induced the hydrogen peroxide accumulation and activated enzymes of antioxidative metabolism. ATP/ADP rate was reduced in all treatment tested. These results indicate that MCA has caused an imbalance on the normal metabolism of *E. heterophylla* roots leading to oxidative stress and reduction on energy charge of this plants.

Keywords: Oxygen consumption. Weed. Allelopathy. Catalase. Peroxidase.

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado fisiológico em que a perda de elétrons excede o seu ganho, e são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos oxidativos aos componentes celulares (DEMIDCHIK, 2015). Dentre as várias formas de EROs encontradas nos sistemas biológicos, o oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, o radical hidroxil ($^{\bullet}\text{OH}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}) representam os principais componentes que induzem ao estresse oxidativo (APEL & HIRT, 2004). As injúrias causadas são rapidamente desencadeadas e podem afetar proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, promovendo, em última instância, a morte celular (GILL & TUTEJA, 2010).

As EROs são formadas naturalmente nos peroxissomos ou durante a fotossíntese e respiração, mais precisamente próximo às cadeias transportadoras de elétrons dos tilacoides e mitocôndrias. Em condições fisiológicas estáveis, as EROs sintetizadas são mitigadas por um aparato antioxidativo que inclui moléculas como glutathiona reduzida, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis e, também, um conjunto de enzimas que compreende a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POD), glutathiona redutase (GR) e dehidroascorbato redutase (DHAR) (GILL & TUTEJA, 2010). No entanto, diversos fatores ambientais podem desfazer este equilíbrio entre produção e remoção de EROs, elevando rapidamente os níveis celulares desses compostos.

Dentre os fatores externos que alteram o estado redox dos vegetais e induz ao estresse oxidativo, está o estresse causado por aleloquímicos (CRUZ-ORTEGA et al., 2007). O monoterpeneo α -pineno, por exemplo, induziu o estresse oxidativo em plântulas de milho e soja por meio da ação direta no metabolismo mitocondrial (ABRAHIM et al., 2003; ISHII-IWAMOTO et al., 2006). O α -pineno parece atuar como desacoplador do transporte de elétrons para a síntese de ATP, diminuindo o potencial da membrana, além de inibir a rota da oxidase alternativa (ABRAHIM et al., 2003). Em conformidade com estes resultados, em raízes primárias intactas, diferentes aleloquímicos promoveram o estresse oxidativo dado o estímulo da respiração insensível ao KCN e aumento na atividade da CAT, POD, GR e lipoxigenase (LOX) (PERGO & ISHII-IWAMOTO, 2011). Não apenas aleloquímicos isolados, mas também extratos vegetais com potencial alelopático, induzem ao estresse oxidativo. RECH et al. (2015) observaram que, em plântulas tratadas com extrato de *Croton argentus*, houve aumento

da atividade de enzimas antioxidativas e da peroxidação lipídica. Somado a isso, os autores constataram inibição da síntese de ATP mitocondrial com decréscimo na produção de malato e succinato (RECH et al., 2015). A indução do estresse oxidativo tem sido sugerida como um dos mecanismos de ação dos aleloquímicos (LARA-NUÑEZ et al., 2006; PERGO et al., 2008; CINIGLIA et al., 2015).

Compreender o modo de ação dos aleloquímicos pode contribuir com a agricultura moderna, sendo fundamental para o manejo de plantas daninhas que apresentam casos de resistência aos herbicidas, além de reduzir os danos ambientais e à saúde humana associados ao uso contínuo destes químicos. *Euphorbia heterophylla* L. é uma planta daninha conhecida popularmente no Brasil como leiteira ou amendoim bravo. Está presente em mais de 25% das lavouras de soja do país e representa uma das principais espécies infestante da cultura (FAO, 2015). A descoberta de químicos naturais com efeito alelopático e do seu mecanismo de ação pode contribuir para a formulação de um novo bioherbicida e, desta forma, auxiliar no manejo dos sistemas agrícolas mundiais.

Mediante o exposto acima, o objetivo deste trabalho foi investigar a ação alelopática do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre *Euphorbia heterophylla*, avaliando as possíveis alterações na atividade respiratória de ápices radiculares isolados, no conteúdo de H₂O₂ e nas atividades de enzimas antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo e tratamento das plantas de *Euphorbia heterophylla*

Ensaio de dose-resposta foram conduzidos com plântulas de *E. heterophylla* para determinar as concentrações de AMC necessárias para inibir o crescimento radicular em 50% (I50) e 80% (I80), concentrações estas utilizadas em todos os experimentos deste estudo. Para obtenção das plântulas, sementes de *E. heterophylla* foram colocadas para germinar e, após 5 dias, as plântulas foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva pH 6,0 (DONG et al., 2006). Os tratamentos foram adicionados à solução nutritiva, sendo eles 47,67 μM (I50) e 190 μM (I80) de AMC, mais o controle (ausência do aleloquímico). Os recipientes contendo as plântulas foram acondicionados em sala de cultivo, onde permaneceram por 48 h sob fotoperíodo de 14 h e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento.

2.2 Avaliação do consumo de oxigênio dos ápices radiculares

O consumo de oxigênio dos ápices radiculares de *E. heterophylla* foi mensurado polarograficamente a 25°C por um eletrodo tipo Clark posicionado numa câmara de acrílico. Aproximadamente 10 mg de ápices radiculares foram adicionados à câmara de acrílico contendo 2 mL de solução nutritiva (pH 5,8) composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM, KNO_3 2 mM, NH_4Cl 0,43 mM, MgSO_4 0,75 e NaH_2PO_4 20 mM (COPELAND, 1992). Para estimar as contribuições individuais da citocromo oxidase mitocondrial (KCN sensível), da oxidase alternativa e das oxidases extra mitocondriais (KCN insensível) para a respiração total, cianeto de potássio (KCN) 200 μM e ácido salicil hidroxâmico (SHAM) 5,0 mM foram adicionados ao meio, respectivamente. O consumo de oxigênio foi calculado a partir dos registros polarográficos, assumindo uma concentração inicial de oxigênio de 240 μM . Os resultados foram expressos em nmol de O_2 consumido $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso fresco.

2.3 Atividade da peroxidase solúvel (EC 1.11.1.7)

A atividade da POD foi determinada pelo método de oxidação do guaiacol (dos SANTOS et al., 2004). Raízes frescas foram pesadas (0,5 g) e maceradas em gral gelado contendo 5 mL tampão fosfato 67 mM (pH 7,0) e 0,1 g de PVP (p/v). O homogeneizado foi centrifugado (3300 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante coletado para análise enzimática e determinação do conteúdo de proteínas. A atividade da POD foi determinada em meio de reação (1,5 mL) contendo tampão fosfato (pH 6,8) 25 mM, guaiacol 2,56 mM e H₂O₂ 10 mM. A reação foi iniciada adicionando-se o extrato enzimático ao meio reativo. A oxidação do guaiacol foi seguida por 5 min a 470 nm em espectrofotômetro e a atividade da enzima calculada pelo coeficiente de extinção (25,5 mM⁻¹ cm⁻¹) do tetraguaiacol. A atividade da POD foi expressa em µmol de tetraguaiacol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.4 Extração genérica para determinação da atividade da superóxido dismutase e catalase

Raízes frescas foram pesadas em balança digital e maceradas em nitrogênio líquido. Adicionou-se tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA 1,0 mM, DTT 3,0 mM e 4% de PVP (p/v) em um volume de 1,5 mL vezes o peso de raiz. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer à -80°C até análise (AZEVEDO et al., 1998).

2.5 Atividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada pelo método fotoquímico do azul de nitro-tetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS, 1977). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), NBT 75 µM, riboflavina 4 µM, metionina 13 µM, EDTA 1,0 mM, além do extrato enzimático. O meio de reação foi incubado sob luz fluorescente (56 µmol m⁻² s⁻¹) por 10 min. A fotoredução do NBT (formação do formazan) foi mensurada espectrofotometricamente a 560 nm. Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT. A atividade da superóxido dismutase foi expressa em unidade (U) de SOD min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.6 Atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada por método espectrofotométrico (TAMÁNKÓVA et al., 2006). O meio de reação continha tampão fosfato 60 mM (pH 7,4) e H₂O₂ 60 mM. A reação foi iniciada adicionando-se 0,1 mL do extrato enzimático. A mistura foi incubada por 4 min a 37°C e a reação paralisada pela adição de molibdato de amônio (32,4 mM). A absorbância das amostras foi determinada em 405 nm e a atividade da enzima calculada pelo coeficiente de extinção 0,0655 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da CAT foi expressa em μmoles de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.7 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas nos extratos enzimáticos foram determinados de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

2.8 Determinação da concentração de H₂O₂

Raízes frescas foram pesadas (0,5 g) e maceradas em gral gelado contendo 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado à 3000 rpm por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer até análise. O meio de reação continha tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio (KI) 5,0 M. A reação foi iniciada adicionando-se 0,5 mL do extrato de raízes. Após 1 min, foi determinada a absorbância da amostra em espectrofotômetro a 390 nm (SERGIEV et al., 1997). A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi calculada pelo coeficiente de extinção 6,159 mM⁻¹cm, sendo expressa em μmol g⁻¹ de massa fresca.

2.9 Determinação da relação ATP/ADP

Raízes frescas foram pesadas em balança digital e maceradas com HClO₄ 0,6 M em um volume de 5,0 mL vezes o peso de raiz. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e neutralizado a pH 6,5-6,8 com KOH 1 M. A mistura neutralizada foi colocada em banho de gelo por 30 min. Após

este tempo, foi efetuada a filtração em papel filtro para remoção do perclorato de potássio (LIU et al., 2005).

As amostras foram novamente filtradas em filtro de 0,45 μm acoplado a uma seringa descartável e analisados em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), equipado com bomba LC-10AD, injetor Rheodine[®], detector UV-VIS SPD-10A, módulo de comunicação CBM-101. Uma coluna (C18) de fase reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) foi utilizada a temperatura de 30°C, juntamente com uma pré-coluna (10 x 4,6 mm) equivalente. A eluição das amostras foi realizada com um gradiente linear gerado com os solventes A (tampão fosfato 44 mM, pH 6,0) e B (tampão fosfato 44 mM mais metanol (1:1-v/v)), sob um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ (COLTURATO et al., 2012). O gradiente foi programado para alternar a proporção do solvente B, em relação ao solvente A, da seguinte maneira: 0,01 a 2,5 min – B aumentando de 0 a 0,5%; 2,501 a 5,0 min – B aumentando de 0,5 a 3%; 5,01 a 7,0 min – B aumentando de 3 a 5%; 7,01 a 8,0 min – B aumentando de 5 a 12%; 8,01 a 10 min – B aumentando de 12 a 15%; 10,01 a 15 min – B aumentando de 15 a 28%; 15,01 a 22 min – B diminuindo a 0%; 22,01 a 30,0 min – 100% de A. Após este tempo, o equipamento foi programado para retornar às proporções iniciais dos solventes. A leitura das amostras foi feita à 254 nm e a identificação dos picos obtida por comparação com os tempos de retenção pela injeção de padrões ATP e ADP sob mesmas condições experimentais. A concentração de cada composto foi realizada de acordo com curva padrão correspondente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação fitotóxica de muitos aleloquímicos afeta direta ou indiretamente vários processos fisiológicos essenciais para as plantas. Dentre eles está a respiração, processo crucial do metabolismo energético celular. A respiração pode ser medida após o isolamento mitocondrial ou determinada em tecidos intactos, como ápices radiculares (ISHII-IWAMOTO et al., 2012). No presente estudo, avaliamos a atividade respiratória de ápices radiculares de plantas de *Euphorbia heterophylla* expostas ao AMC e os resultados foram representados na Figura 1.

A taxa de consumo total de oxigênio, medida na ausência dos inibidores SHAM e KCN no meio de reação, foi elevada em 20 e 47% nas plantas tratadas com as doses I50 e I80 de AMC, respectivamente. A respiração insensível ao KCN, que representa a respiração via oxidase alternativa somada à atividade das oxidases extramitocondriais, também foi aumentada de forma dose-dependente pelos tratamentos com AMC. Por outro lado, um decréscimo na respiração sensível ao KCN, que representa a contribuição da citocromo oxidase para a respiração total, foi observado apenas no tratamento I80. A respiração sensível ao SHAM não foi afetada pelos tratamentos analisados.

Os resultados demonstraram que a fosforilação oxidativa mitocondrial foi reduzida no tratamento I80, como indicado pelo baixo valor da respiração sensível ao KCN. Este fato pode estar associado com uma diminuição da demanda por ATP, provocada pela presença do AMC, uma consequência do desequilíbrio do metabolismo energético das plantas de *E. heterophylla*, assim como de outros processos metabólicos, que acabou reduzindo o crescimento das plantas. Alterações na atividade respiratória de raízes de plantas daninhas expostas a uma variedade de aleloquímicos também foram observadas por outros autores (PERGO & ISHII-IWAMOTO, 2011).

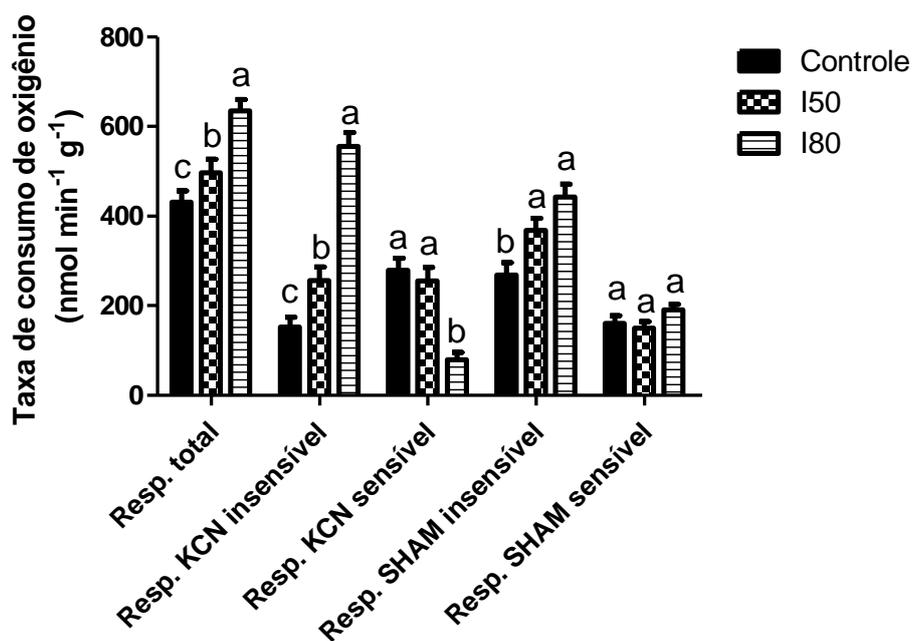


Figura 1. Atividade respiratória dos ápices radiculares de plantas de *E. heterophylla* tratadas com ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade. Respiração total: taxa de consumo de oxigênio na ausência de inibidores; Respiração KCN sensível: diferença entre o consumo total de oxigênio e a respiração insensível ao KCN. Respiração SHAM sensível: diferença entre o consumo total de oxigênio e a respiração SHAM insensível.

O aumento da respiração KCN insensível ocorre quando o oxigênio é convertido em superóxido e peróxido de hidrogênio, ou ainda é utilizado pela oxidase alternativa mitocondrial e outras oxidases citosólicas ou ligadas à membrana. Como a respiração sensível ao inibidor SHAM não diferiu entre os tratamentos (Figura 1), o consumo de oxigênio insensível ao KCN, observado para I50 e I80, sugere a atividade daquelas oxidases nas plantas tratadas. Para confirmar esta hipótese, foi determinada a atividade de algumas relacionadas ao estresse oxidativo.

As concentrações do AMC, que inibem o crescimento das raízes de *E. heterophylla*, aumentaram significativamente a atividade da enzima peroxidase (POD) (Figura 2) em 153% e 38% para I50 e I80, respectivamente, comparadas ao controle ($8,03 \pm 0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína). Somado a isto, a atividade da enzima catalase (CAT) também aumentou 11,5% para o I80 comparada ao controle ($15,87 \pm 0,63 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) (Figura 3). No entanto, nenhuma mudança foi observada para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 4).

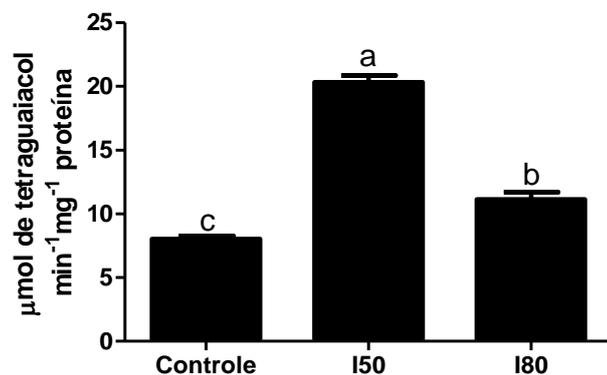


Figura 2. Atividade da peroxidase (POD) solúvel de raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μM; I80 = 190 μM. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

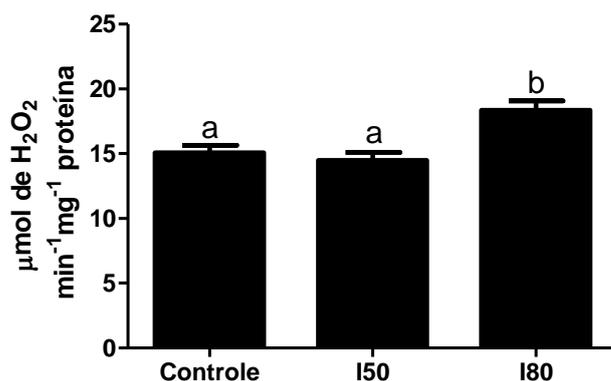


Figura 3. Atividade da catalase (CAT) de raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μM; I80 = 190 μM. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

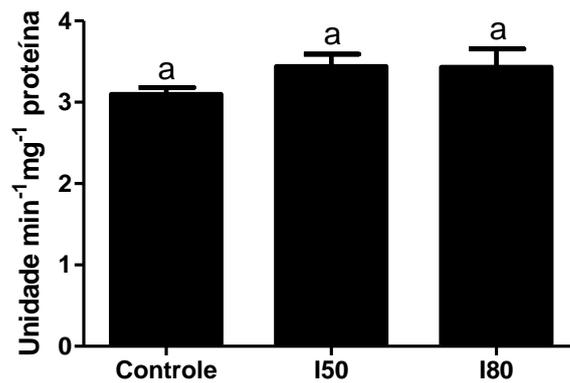


Figura 4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) de raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

POD, CAT e SOD são enzimas reconhecidas como mantenedoras da homeostase celular, trabalhando no combate às altas concentrações de EROs (H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$), que são formados naturalmente durante processos vitais dos vegetais superiores. Alterações nestas vias que geram EROs, como por exemplo a mitocondrial, assim como mudanças do comportamento enzimático antioxidativo, podem representar mecanismos que fundamentam a fitotoxicidade de químicos naturais presentes na germinação e/ou crescimento inicial de alguma planta (ISHII-IWAMOTO et al., 2012). Pergo et al. (2011) avaliaram os efeitos de alguns aleloquímicos no metabolismo energético e enzimas relacionadas ao estresse antioxidativo na planta daninha *Ipomoea triloba* L. Os autores concluíram que o aumento nas atividades da CAT, POD e lipoxigenase, assim como, o aumento da respiração insensível ao KCN, podem ser o resultado da presença dos aleloquímicos durante a germinação e crescimento inicial da planta, que resultou em aumento do estresse oxidativo. Em concordâncias com estes resultados, Rech et al. (2015) observaram que o efeito alelopático do extrato de *Croton argenteus* está relacionado à indução do estresse oxidativo, dado pelo incremento nas atividades da POD, CAT, SOD e GR. Além disso, o metabolismo energético das plantas tratadas também foi afetado, com decréscimo na síntese de ATP, seguido por diminuição na produção de malato e succinato.

Estresses bióticos e abióticos podem aumentar a produção de EROs e afetar negativamente várias funções celulares devido aos danos causados nos ácidos nucleicos,

na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. EROs incluem radicais livres como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , HO_2^{\bullet} e RO^{\bullet} e também formas moleculares (não radicais) como o H_2O_2 e 1O_2 . A quantificação dessas espécies é de fundamental importância no estudo do estresse oxidativo, principalmente para explicar o comportamento enzimático antioxidativo. Todavia, a alta reatividade e curto tempo de meia vida dificultam a análise dessas substâncias. O H_2O_2 é uma ERO com reatividade moderada e seu tempo de meia vida é relativamente longo (1 ms), que o torna uma das principais moléculas mensuradas em casos de estresse. Neste sentido, foi determinada a concentração de H_2O_2 nas raízes de *E. heterophylla* expostas ou não ao AMC e os resultados estão apresentados na Figura 5. Foi possível notar um aumento significativo de 70% no teor de H_2O_2 nas raízes crescidas na presença de AMC, quando comparado com o controle.

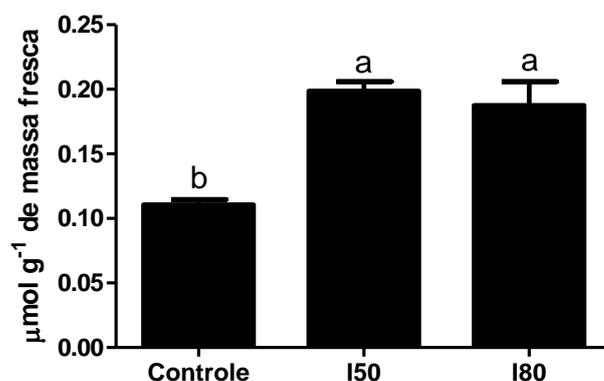


Figura 5. Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μM ; I80 = 190 μM . Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

A redução univalente de $O_2^{\bullet-}$ produz H_2O_2 e, por isso, os sítios de produção do $O_2^{\bullet-}$ também são considerados centros de origem do H_2O_2 (GILL & TUTEJA, 2010). SOD é a principal enzima avaliada em condições de estresse que promove a síntese de $O_2^{\bullet-}$, pois catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . No presente estudo, apesar de ser encontrado elevados níveis de H_2O_2 nas raízes de *E. heterophylla* tratadas com o AMC, não foram observadas alterações significativas na atividade da SOD. Este resultado pode ser explicado pelo fato de existirem outras vias que também produzem H_2O_2 em condições de estresse como, por exemplo, a dismutação de $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet-}$, realizado por NADPH oxidases e heme-peroxidases Classe III, ambas enzimas encontradas no espaço extracelular (APEL & HIRT, 2004; DEMIDCHIK, 2015). Desta forma, o AMC pode

alterar estas outras vias de síntese favorecendo o acúmulo de H_2O_2 , que, por sua vez, pode difundir-se para o citoplasma e estimular a atividade das enzimas CAT e POD.

O balanço entre as enzimas SOD, POD e CAT é crucial para suprimir o efeito tóxico dos níveis de EROs celular. Não raro, uma enzima pode estar ativada enquanto a outra permanece sem alteração (APEL & HIRT, 2004). Este pode ser o motivo pelo qual foi possível detectar diferenças na atividade enzimática da POD e CAT nos tratamentos analisados. A enzima POD está mais ativa na I50, comparada ao I80, enquanto que a CAT, nesta mesma concentração, não apresentou diferenças significativas com as plantas controle (Figuras 2 e 3). Já, para a I80, a atividade da POD é maior que o controle e menor que a I50, porém, houve ativação da CAT para a maior concentração. Assim, a I80 requer ambas enzimas, POD e CAT, para minimizar os efeitos deletérios da alta concentração de H_2O_2 , enquanto que a I50 ativa apenas a POD. Com base nestes resultados, o efeito fitotóxico do AMC pode ser devido, pelo menos em parte, a indução do estresse oxidativo nas raízes de *E. heterophylla*, como indicado pela alteração da atividade das enzimas POD e CAT. A ativação dessas enzimas, por sua vez, representa um dos possíveis mecanismos de defesa diante da elevada concentração de H_2O_2 .

Adenilatos (ATP, ADP e AMP) participam de várias reações celulares e são importantes reguladores de muitas reações metabólicas. O nível de forforilação destes compostos indica o status energético celular e a razão ATP/ADP pode ser utilizada para este fim. A Figura 6 apresenta a razão ATP/ADP das raízes de *E. heterophylla* expostas ao AMC. Como pode ser observado, a razão ATP/ADP diminuiu significativamente com o aumento da concentração. Alterações na razão ATP/ADP podem ser o resultado de uma alteração da cinética da ATPase ou oriundo de perturbações no equilíbrio entre síntese e demanda de ATP.

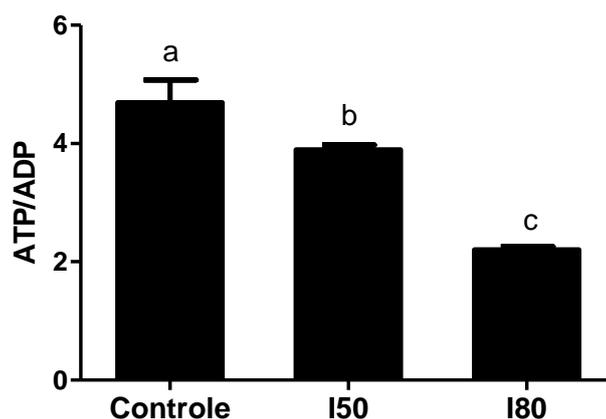


Figura 6. Razão ATP/ADP de raízes de *E. heterophylla* expostas ao ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). I50 = 47,67 μ M; I80 = 190 μ M. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* à 5% de probabilidade.

É importante ressaltar que o mecanismo de ação de muitos químicos naturais que induzem o estresse oxidativo é ainda pouco conhecido. Apesar dos avanços no mecanismo molecular, é difícil concluir se estes aleloquímicos são causa ou efeito da produção de EROs (SYTYKIEWICZ, 2011). No manejo integrado de plantas daninhas, é comum a utilização de herbicidas que causa a morte do vegetal, além de outros fatores, pela indução do estresse oxidativo. Este fenômeno é comum em herbicidas dos grupos inibidores do fotossistema II e I, e, também, nos herbicidas que inibem a síntese de compostos antioxidantes, como os carotenoides. Desta forma, a seleção de aleloquímicos com ação oxidativa que inibam o crescimento e desenvolvimento de plantas daninhas pode contribuir para a formulação de um novo herbicida.

4. CONCLUSÃO

O AMC alterou a respiração normal dos ápices radiculares da *Euphorbia heterophylla* e, possivelmente, desencadeou um estresse oxidativo nas plantas. Estimulou a respiração extramitocondrial em todos os tratamentos avaliados e inibiu a respiração KCN sensível, apenas para a maior concentração testada. Porém, a carga energética celular, representada pela relação ATP/ADP, foi significativamente reduzida em todos os tratamentos. O teor de H₂O₂ foi incrementado, assim como as atividades das enzimas POD e CAT. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade da SOD.

5. REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, D., FRANCISCHINI, A. C., PERGO, E. M., KELMER-BRACHT, A. M., ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 11-12, p. 985-991, 2003.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.
- AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification os microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CINIGLIA, C., MASTROBUONI, F., SCORTICHINI, M., PETRICCIONE, M. Oxidative damage and cell-programmed death induced in *Zea mays* L. by allelochemical stress. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 926-937, 2015.
- COLTURATO, C. P., CONSTANTIN, R. O., MAEDA, J.R., CONSTANTIN, R. P., YAMAMOTO, N. S., BRACHT, A., ISHII-IWAMOTO, E. L., CONSTANTIN, J. Metabolic effects of silibin in the rat liver. **Chemico-Biological Interaction**, v 195, p 119-132. 2012.
- COPELAND, L., LIMA, M. L. The effect of aluminium on enzyme activities in wheat roots. **Plant Physiology**, v. 140, p. 641-645, 1992.
- CRUZ-ORTEGA, R.; LARA-NÚÑEZ, A.; ANAYA, A. L. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 2, p. 269-270, 2007.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.
- DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, 2006.
- DOS SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., FINGER, A., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in Glycine maz root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 1203-1212, 2004.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Euphorbia heterophylla* L., 2015. Disponível em: < <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/biodiversity/weeds/listweeds/eup-het/en/> >. Acesso em: 29/06/2015.

GIANNOPOLITIS, C. N., RIES, S. K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

ISHII-IWAMOTO, E. L., ABRAHIM, D., SERT, M. A., BONATO, C. M., KELMER-BRACHT, A. M., BRACHT, A. Mitochondria as a site of allelochemical action. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N., *et al* (Ed.). **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. The Netherlands: Spring Science, 2006. p.267-284.

ISHII-IWAMOTO, E. L., PERGO, E. M.; REIS, B.; MOSCHETA, I. S.; BONATO, C. M. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, p. 50-64, 2012.

LARA-NUÑEZ, A., ROMERO-ROMERO T., VENTURA, J. L., BLANCAS, V., ANAYA A. L, CRUZ-ORTEGA, R. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 11, p. 2009-2016, 2006.

LIU, H., JIANG, Y., LUO, Y., JIANG, W. Simple and rapid determination of ATP, ADP and AMP concentration in pericarp tissue of litchi fruit by high performance liquid chromatography. **Food Technology and Biotechnology**. v 4, p 531-534. 2006.

PERGO, E. M. ABRAHIM, D., SILVA, P. C. S., KERN, K. A., SILVA, L. J., 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.

PERGO, E. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Changes in Energy Metabolism and Antioxidant Defense Systems During Seed Germination of the Weed Species *Ipomoea triloba* L. and the Responses to Allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 5, p. 500-513, 2011.

RECH, K. S., SILVA, C. B., KULIK, J. D., DIAS, J. F., ZANIN, S. M., KERBER, V. A., OCAMPOS, F. M., DALARMI, L., SANTOS, G. O., SIMIONATTO, E., LIMA, C. P, MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D. *Croton argenteus* preparation inhibits initial growth, mitochondrial respiration and increase the oxidative estresse from *Senna occidentalis* seedlings. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 1-11, 2015.

SERGIEV, V., ALEXIEVA, E., KARANOV, E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus de L Academie Bulgare des Sciences**, v. 51, p. 121-124, 1997.

SYTYKIEWICZ, H. Expression Patterns of Glutathione Transferase Gene (GstI) in Maize Seedlings Under Juglone-Induced Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 7982-7995, 2011.

TAMÁNKÓVA, K., LUHOVÁ, L., PETRVALSKY, M., PEC, P., LEBEDA, A.
Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between
Lycopersicon spp and *oidium neolycopersici*. **Physiological and Mocolular Plant
Pathology**, v. 68, n. 22-32, 2006.