

BRUNO REIS

**Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na
germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L.
Merril, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L.**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011**

BRUNO REIS

**Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na
germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L.
Merril, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L.**

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011

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

Reis, Bruno
0375e 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. / Bruno Reis. -- Maringá, 2011.
42 f. : il., graf.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2011.

1. Alelopatia. 2. Citronela. 3. Mitochondria. I. Osvaldo Ferraresi Filho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. III. Título.

CDD 21.ed.571.92

BRUNO REIS

**Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt na
germinação, respiração e crescimento de plântulas de *Glycine max* L.
Merril, *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla* L.**

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

Defesa em: 28/02/2011

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
(Orientador)

Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Aos meus pais Carlos e Iara, ao meu irmão Felipe, a minha mais que
companheira Bruna, aos meus avôs, aos amigos e especialmente ao meu avô Geraldo
Buzolin agradeço eternamente pelo carinho, confiança e amor recebidos durante a vida
e além dela...

*O aprendizado transcende a dor, supera o medo e os antigos conceitos.
Desde que tudo seja visto com amor.
De quem faz o que gosta e aprende a gostar do que faz.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e me levar pelo caminho correto, nem mais fácil, nem mais difícil que o necessário.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Fisiologia e Homeopatia Vegetal e Laboratório de Oxidações Biológicas, por todos os bons momentos vividos e trabalhos realizados com amizade, carinho, dedicação e boa vontade raramente vistos nos dias de hoje.

Ao professor Osvaldo Ferrarese Filho pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Ao professor Carlos Moacir Bonato pela amizade, carinho e dedicação a pesquisa e aos seus alunos, mas principalmente pelo exemplo de índole e caráter que é, lecionando disciplinas para a vida.

A minha amiga e mãe substituta Maria Isabel, por todo o carinho e dedicação durante esses anos.

Agradeço a todos os professores da graduação e pós-graduação da agronomia pelo aprendizado e dedicação ao trabalho.

A todos os funcionários dos departamentos de agronomia e biologia pela ajuda e compreensão.

Agradeço a todos os desafios e dificuldades encontradas que só contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Agradeço ao CNPQ pela bolsa de estudos tão importante para a realização deste sonho.

BIOGRAFIA

BRUNO REIS, filho de Carlos Eduardo Reis e Iara Cristina Buzolin Reis, nasceu dia 08 de fevereiro de 1986, em São Paulo –SP.

Estudou em colégio públicos até a quarta série do primeiro grau, passando então para o ensino privado.

Foi aprovado no primeiro vestibular que prestou pela Universidade Estadual de Maringá em 2004 na qual se graduou Engenheiro Agrônomo no ano de 2009.

Iniciou em março de 2009 o Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá e apresentou à Banca examinadora a defesa em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. <i>Glycine max</i> L. Merril	3
2.2. <i>Euphorbia heterophylla</i> L.	4
2.3. <i>Ipomoea grandifolia</i>	5
2.4. <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	5
3. MATERIAIS E METODOS.....	8
3.1. Material biológico	8
3.2. Local dos experimentos	8
3.3. Método geral de germinação.....	8
3.4. Determinação das variáveis de germinação	9
3.4.1. Porcentagem de germinação (PGER)	9
3.4.2. Tempo Médio de Germinação (TMG).	10
3.4.3. Velocidade Média de Germinação (VMG).	10
3.4.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG).	10
3.4.5. Razão parte aérea sistema radicular (RPA/SR).	10
3.4.6. Conteúdo de água da parte aérea (CAPA).	10
3.4.7. Conteúdo de água da raiz (CAR).....	11
3.4.8. Conteúdo de água total (CAT).....	11
3.4.9. Massa seca (MS).....	11
3.5. Determinação da atividade respiratória de embriões.....	11
3.6. Isolamento de mitocôndria.....	12
3.7. Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de <i>Euphorbia heterophylla</i> L.	13

3.7.1. Determinação do teor de proteínas.....	13
3.8. Delineamento estatístico.	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação.....	15
4.2. Efeito do óleo essencial sobre as variáveis de crescimento	20
4.3. Efeito do óleo essencial na respiração.....	30
5. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

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. Orientador: Professor Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Co-orientador: Professor Dr. Carlos Moacir Bonato.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito bioherbicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela) sobre as variáveis de germinação, crescimento e respiração de *Glycine max* L. Merrill (soja), e das plantas daninhas *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro). As sementes das três espécies foram submetidas a diferentes concentrações (0, 0,03, 0,06, 0,12 e 0,25% com 2% de DMSO) do óleo essencial de *C. winterianus*. As sementes foram dispostas em placas de petri com as concentrações correspondentes do óleo essencial e acondicionadas em BOD a 25⁰C com fotoperíodo de 12h por 7 dias. Foram determinadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (PGER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), comprimento total (CT), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST), conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR), conteúdo de água total (CAT) e respiração de embriões pré-tratados com óleo essencial. Determinou-se ainda o efeito direto do óleo essencial sobre a respiração mitocondrial de *E. heterophylla* (leiteiro). Os dados foram submetidos a ANOVA e as variáveis quantitativas analisadas por regressão polinomial a 5% de probabilidade. O óleo essencial de citronela inibiu a germinação sendo seu efeito diretamente proporcional ao aumento da concentração testada em todas as espécies estudadas. As variáveis de germinação PGER, VMG, IVG, TMG foram drasticamente afetadas pela presença do óleo essencial nas três espécies testadas. O valores de CT, CPA, CSR e RPA/SR também apresentaram resultados significativos tendendo a zero nas três espécies. A presença do óleo essencial reduziu acentuadamente os valores de MSPA, MSR, MST, CAPA, CAR e CAT das três espécies estudadas. O consumo total de

oxigênio (na ausência de inibidor) e, o consumo de oxigênio, na presença do inibidor SHAM (respiração sensível ao cianeto) foram afetados pelo pré-tratamento dos embriões com o óleo essencial nas três espécies. O óleo essencial de *C. winterianus* reduziu significativamente a fosforilação oxidativa mitocondrial em *E. heterophylla* medida pelo consumo de O₂ durante o consumo do ADP (estado III) e a relação ADP/O quando se utilizou o NADH ou L-malato como substrato respiratório. As outras variáveis - estado basal, estado IV e controle respiratório não diferiram significativamente do controle. Os resultados demonstram que o óleo essencial afeta drasticamente tanto a respiração total como a sensível ao KCN. Esta interferência na respiração acoplada à fosforilação oxidativa sugere que o óleo essencial pode interferir no complexo ATP sintase e/ou no suprimento de adenilatos, como por exemplo na quantidade de ADP que chega até a matriz mitocondrial e que é capaz de ser fosforilado, ou ainda, na quantidade de esqueletos carbônicos que chegam ao interior mitocondrial (passagem pela membrana). Desta forma, o efeito do óleo essencial na respiração explica, pelo menos em parte, sua influência, sempre negativa, nas variáveis de germinação e crescimento das espécies estudadas. Deve-se ressaltar ainda que a *G. max* de forma geral foi menos afetada que as plantas daninhas. Assim, o óleo essencial de citronela possui grande potencial para ser utilizado como bioherbicida. Entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados, em nível metabólico e em nível de campo para que conclusões definitivas possam ser obtidas.

Palavras-chave: Mitochondria, Citronela, Alelopatia, Leiteiro, Corda-de-viola, *Cymbopogon nardus*.

ABSTRACT

Effect of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt on germination, respiration and growth of seedlings the *Glycine max* L. Merril, *Ipomoea grandifolia* and *Euphorbia heterophylla* L. Adviser: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Co-Adviser: Dr. Carlos Moacir Bonato.

The objective of this experiment was to study the bioherbicida effect of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt on germination, growth and respiration of *Glycine max* L. Merrill (soybean), and weed *Ipomoea grandifolia* (string-de-viola) and *Euphorbia heterophylla* (dairy). The three species seeds were treated with different concentrations (0, 0.03, 0.06, 0.12 and 0.25% with 2% DMSO) of essential oil of *C. winterianus*. Seeds were placed on plates with the corresponding concentrations of essential oil and placed in chamber at 25⁰C with a photoperiod of 12 h for 7 days. We evaluated the following variables: germination percentage (PGER), germination average time (TMG), germination average speed (VMG), germination speed index (IVG), shoot length (CPA), length of root system (CSR), total length (CT), shoot / root system ratio (RPA/SR), shoot dry mass (MSPA), root dry mass (MSR), total dry matter (MST), shoot water content (CAPA), root water content (CAR), total water content (CAT) and respiration of embryos pretreated with essential oil. It also determined the direct effect of essential oil on mitochondrial respiration of *E. heterophylla* (dairy). The data were analyzed by ANOVA and the significant variables analyzed by regression at 5% probability. Essential oil of citronella inhibited germination and this effect was directly proportional to the concentration tested in all species studied. Germination variables PGER, VMG, IVG, TMG were affected drastically by presence of essential oil in the species tested. The values of CT, CPA, CSR and RPA/SR also showed significant decreases tending to zero for all species. The presence of essential oil markedly reduced the amounts of MSPA, MSR, MST, CAPA, CAR and CAT of the three species. The values of total oxygen consumption, and the inhibitor SHAM (cyanide-sensitive respiration) were affected by pretreatment of embryos with the essential oil of all species. The essential oil of *C. winterianus* significantly reduced mitochondrial oxidative phosphorylation measured by O₂ consumption during ADP phosphorylation (state III) and for ADP/O when using NADH or malate as respiratory substrate. The

other variables - basal, state IV and respiratory control did not differ significantly from control. The results demonstrate that the essential oil dramatically affects both the total respiration and the sensitive to KCN one. Soybean was among the least affected, in practically all variables when compared to the weeds. The fact of the essential oil interfere with respiration coupled with oxidative phosphorylation suggests that the oil may be interfering with the ATP synthase complex, and adenylate or supply, such as the amount of ADP that reaches the mitochondrial matrix and that is capable of being phosphorylated, as well as in the amount of carbon skeletons that come within the mitochondria. Thus, the respiratory effect may explain, at least in part the influence of essential oil on the germination variables and growth of three plants species. Thus, the essential oil of citronella has great potential to be used as bioherbicide. However, it remains to be done important detailed studies at metabolic level at the level of field so that definitive conclusions can be reached.

Key words: Mitochondria, Citronella, Allelopathy, Dairy, String-of-viola, *Cymbopogon nardus*.

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade sabe-se que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento de outras que se encontram nas proximidades. Por muito tempo esse fato foi tido como inexplicável (GOLDFARB, 2009). Em 1996 a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu o termo alelopatia como sendo “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e o desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos” (REIGOSA, 2006).

Atualmente sabe-se que as plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que aparentam não ter função direta no crescimento e desenvolvimento, conhecidos como metabólitos secundários. Geralmente estes metabólitos influenciam diretamente os processos de respiração, fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os metabólitos secundários também se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita dentre os vegetais, podendo restringir-se a uma única espécie, o que não ocorre com os metabólitos primários que podem ser encontrados em todo o reino vegetal. Os estudos sobre os metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, visando à obtenção e identificação de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e utilização em indústrias (DUDAI *et al.*, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Sugere-se que muitos metabólitos secundários possuam funções ecológicas importantes para os vegetais, como proteção contra herbívoros e infecções por microrganismos patogênicos, atuação como atrativos para a polinização e dispersão de sementes, atuação na competição planta-planta e simbiose planta-microrganismo. É comum encontrar em plantas monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, mais conhecidos como óleos essenciais, que conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade, repelindo potenciais herbívoros (DUDAI *et al.*, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Por outro lado, o uso rotineiro de herbicidas sintéticos tem gerado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, gerarem risco para a fauna silvestre e contaminarem os alimentos que entram na dieta

humana. Há necessidade de superar os paradigmas a respeito do controle de plantas daninhas, buscando métodos que sejam eficientes no controle e que respeitem os interesses da sociedade e os recursos naturais. (SOUZA FILHO, 2005).

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

Apesar dos estudos feitos, não se encontram na literatura informações mais detalhadas sobre o efeito dos óleos essenciais, em especial do *Cymbopogon winterianus* (capim-citronela) em plantas daninhas de importância agrícola no Brasil. Desta forma, o estudo do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na germinação, no crescimento e mesmo no metabolismo respiratório pode auxiliar sobremaneira o entendimento da ação destes compostos em inibir a germinação e/ou crescimento de plantas invasoras de interesse para a agricultura brasileira. Além disso, este estudo pode fornecer subsídio para o isolamento e teste de novas moléculas com potencial para substituir os atuais herbicidas, com menor impacto ambiental. Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade bioherbicida do óleo essencial de *C. winterianus* sobre a germinação, crescimento e respiração de *E. heterophylla*, *I. grandifolia*, e *G. max*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Glycine max* L. Merrill

A cultura da soja é uma das mais importantes culturas produzidas no país, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial e responsável por 57,1 milhões de toneladas, ocupando área de 21,7 milhões de ha, representando significativa porção do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2009).

O Paraná é o segundo maior produtor de soja, responsável por 9,51 milhões de toneladas (16,65% da produção brasileira), ocupando área de 4,1 milhões de ha, sendo o Paraná responsável por 4,52% da produção mundial de soja (BRASIL, 2009).

Dentre todos os fatores que reduzem a produtividade desta cultura, as plantas daninhas certamente encontram-se entre as maiores causas de redução da produtividade, podendo representar mais de 25% do custo de produção para o controle. Dentre as plantas daninhas mais significativas na redução da produtividade de soja no estado do Paraná encontra-se a *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*, principalmente pelo difícil controle empregado e pelas perdas ocasionadas à cultura (VOLL *et al.*, 2002).

Os casos de resistência aliados à utilização de um ou alguns herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, dificultam cada vez mais o controle destas plantas daninhas, o que pode acarretar um significativo aumento no custo de produção da cultura (EMBRAPA, 2010).

Outro fator determinante é relacionado ao monopólio imposto por grandes corporações multinacionais após o advento dos transgênicos resistentes ao glifosato; ao comercializar as sementes e o herbicida, essas corporações incentivam, de certa forma, a utilização de apenas um mecanismo de ação, o que aumenta a pressão de seleção sobre as populações de plantas daninhas, aumentando a chance de surgimento de populações resistentes a este herbicida. Além disso, alguns herbicidas, como o glifosato podem prejudicar o crescimento e mesmo a produtividade em plantas transgênicas. Zobiolo *et al.* (2010), testando doses crescentes de glifosato em plantas transgênicas de soja

resistentes ao glifosato, verificaram que este herbicida acarretou severa redução de biomassa, absorção de água e taxa fotossintética.

2.2. *Euphorbia heterophylla* L.

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

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

A *E. heterophylla* em competição com a cultura da soja causa diversos problemas, como redução de 22% da produtividade da cultura, considerando uma densidade populacional da planta daninha de 10 plantas por m⁻² (VOLL *et al.*, 2002). Outros resultados mais preocupantes indicam que apenas uma ou duas plantas de *E. heterophylla* por m⁻² reduzem a quantidade de trifólios, o acúmulo de matéria seca e o teor de micronutrientes das plantas de soja, causando interferência devido ao estresse causado às plantas, acarretando alterações morfofisiológicas e redução na produção da cultura (CARVALHO *et al.*, 2010).

De todos esses estudos, destaca-se a grande necessidade de novos métodos de controle, incluindo novos mecanismos de ação dos herbicidas utilizados para o efetivo controle desta espécie tão danosa para culturas com grande importância econômica para o país, como a cultura da soja. A *E. heterophylla* é resistente a princípios ativos

largamente utilizados como o glifosato, a resistência a este princípio ativo está relacionada à utilização da soja transgênica resistente a glifosato, que, devido à pressão de seleção gerada pela utilização contínua de uma única molécula seleciona populações resistentes de diversas espécies ao redor do mundo (POWLES, 2008).

2.3. *Ipomoea grandifolia*

A *Ipomoea grandifolia* conhecida popularmente como corda-de-viola, campainha, jetirana e corriola pertencente à família Convolvulácea. Raramente é utilizada como planta ornamental e, por crescer sobre obstáculos, é utilizada para cobrir caramanchões. (AZANIA *et al.*, 2003).

É uma espécie nativa da América do Sul, ocorrendo na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil, onde é a mais comum espécie de *Ipomoea* encontrada como infestante em lavouras. Possui ciclo anual de 120 a 180 dias e se reproduz por sementes; apresenta porte herbáceo com caule e ramos volúveis que se emaranham em plantas vizinhas e tem sido a espécie mais frequente em lavouras de soja, dificultando a colheita e causando diminuição da produtividade pela competição (KISSMANN & GROTH, 1999).

Resultados obtidos por Voll *et al.* (2002) demonstram que apenas três plantas de *Ipomoea grandifolia* por m² reduzem cerca de 10% da produtividade de soja através da competição entre espécies, sem considerar as perdas ocasionadas na colheita, onde a simples presença desta espécie acarreta grandes prejuízos pelo aumento da dificuldade na colheita da soja. Assim se faz necessário o controle desta espécie para evitar grandes prejuízos para os produtores.

2.4. *Cymbopogon winterianus* Jowitt

A citronela, capim-citronela ou citronela-de-java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt, sinonímia *Cymbopogon nardus* Rendle) pertence à família Poaceae e ao gênero

Cymbopogon; é cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América, tendo sido introduzida no Brasil em 1959 (SHASANY, 2000).

O principal produto desta cultura é o óleo essencial, utilizado em indústrias farmacêuticas, de perfumaria e cosméticos. É principalmente utilizado em repelentes de insetos e produtos sanitários (SHASANY, 2000)

Entretanto, existem pesquisas comprovando não apenas o efeito repelente de óleo de citronela, como ação inseticida (LABINAS & CROCOMO, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2007), acaricida (OLIVO, *et al.*, 2008; CLEMENTE *et al.*, 2010), antibacteriana (COSTA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010), antifúngica (PEREIRA, 2009), indutora de resistência (SILVA, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008;) e herbicida (BORGES *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2004; MARCO *et al.*, 2004; OOTANI, 2010; VIEIRA *et al.*, 2004). Marques *et al.* (2008) realizaram experimentos com o óleo essencial de *C. winterianus* como preparado homeopático, observando efeitos estimulantes sobre a porcentagem de germinação, velocidade de germinação, massa fresca, comprimento radicular e da parte aérea de *Sida rhombifolia*.

Em estudos sobre o efeito na germinação de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), VIEIRA *et al.* (2004) obtiveram resultados inibitórios significativos nas concentrações superiores a 0,5 mL L⁻¹ de óleo de citronela, semelhantes aos resultados do óleo essencial de alecrim-pimenta.

Correa *et al.* (2004) ao estudar os efeitos alelopáticos do óleo essencial de citronela sobre a germinação de picão-preto e milho em diferentes épocas de aplicação concluíram que soluções contendo 1% de óleo essencial de citronela aplicados em pré-plantio, plantio e pós-plantio afetaram significativamente a germinação de picão-preto.

Em outro experimento Marco *et al.* (2004) testaram diferentes concentrações do óleo essencial de citronela (0; 0,25; 0,5 e 1 mL L⁻¹) sobre a germinação de *Chloris barbata*, Sw (capim-branco) e verificaram que em todas as concentrações testadas houve inibição total da germinação desta espécie.

Ao testar as mesmas concentrações acima citadas, Borges *et al.* (2004) testando sementes de *Emilia sonchifolia* (falsa-serralha) observaram inibição total da germinação em concentrações iguais ou superiores a 0,5 mL L⁻¹, e 15,8% de inibição na germinação na concentração de 0,25 mL L⁻¹.

Ootani (2010) ao estudar o efeito alelopático do óleo essencial de citronela, de eucalipto citrodora e do composto secundário citronelal sobre *Digitaria horizontalis* com 4 folhas em vasos, observaram que as plantas apresentaram sintomas de

fitotoxicidade nas folhas 24 horas após a aplicação em todos os tratamentos. Os principais sintomas apresentados foram pontos com aspecto encharcado, caracterizando perda da permeabilidade da membrana. As plântulas apresentaram também clorose, e redução de 50% no acúmulo de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Os autores comentam que a severidade e a velocidade dos sintomas de fitotoxicidade se assemelham aos provocados pela aplicação de herbicidas inibidores do fotossistema I, concluindo que o óleo de citronela e de eucalipto *citrodora* apresentam potencial herbicida.

Entre as substâncias contidas no óleo essencial analisado por Pereira (2009) utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) encontram-se como principais constituintes: Citronelal (23,6%), Geraniol (18,8%), Citronelol (11,8%), Eugenol (10,3%), Elemol (6,7%), β -elemeno (6,4%) e Citronelil acetato (5,3%).

Resultados semelhantes foram encontrados por Chiaradia *et al.* (2009), identificando os seguintes constituintes: Citronelal (35,3%), Geraniol (16%), Citronelol (12,3%), Elemol (4,6%) e Citronelil acetato (4,5%). Outros autores apresentaram resultados semelhantes (CASSEL & VARGAS, 2006; KOFFI *et al.*, 2009 e CASTRO *et al.*, 2010), concluindo que os principais constituintes do óleo essencial de citronela são o Citronelal, Geraniol, Citronelol e Elemol.

Ao se analisarem os experimentos realizados conclui-se que os resultados obtidos são muito significativos, merecendo estudos aprofundados, na tentativa de identificar um ou alguns mecanismos de ação das substâncias contidas no óleo essencial de *C. winterianus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As sementes de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim bravo) e *Ipomoea grandifolia* L. (corda-de-viola) foram obtidas da empresa Cosmos de São Paulo, armazenadas em dessecador acondicionado na geladeira. As sementes de *Glycine max* (L.) Merrill da variedade BRS 283 foram obtidas da Embrapa soja.

3.2. Local dos experimentos

Os experimentos de germinação foram realizados no laboratório de homeopatia e fisiologia vegetal; já os experimentos de respiração e extração de mitocôndria foram realizados no laboratório de oxidações biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR durante o ano de 2010.

3.3. Método geral de germinação

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

Os tratamentos foram constituídos de quatro concentrações de óleo essencial de *C. winterianus* (0,03, 0,06, 0,12 e 0,25% (v/v)) diluídos em dimetilsulfoxido (DMSO)

(2%, v/v). Os controles foram constituídos de água destilada pura e água destilada com DMSO (2%, v/v). Como não houve diferença entre a água destilada e a solução DMSO 2% optou-se por colocar nos resultados apenas os dados do controle da solução DMSO 2%.

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

3.4. Determinação das variáveis de germinação

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

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

3.4.1. Porcentagem de germinação (PGER)

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

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

3.4.2. Tempo Médio de Germinação (TMG)

$$TMG = \frac{\sum n_i \cdot t_i}{\sum n_i}$$

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

3.4.3. Velocidade Média de Germinação (VMG)

É o inverso de TMG, expresso em horas.

$$VMG = \frac{\sum n_i}{\sum n_i \cdot t_i}$$

3.4.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

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

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

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

$$RPA/SR = CPA/CSR$$

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

3.4.6. Conteúdo de água da parte aérea (CAPA)

$$CAPA = MFPA - MSPA$$

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

3.4.7. Conteúdo de água da raiz (CAR)

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

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

3.4.8. Conteúdo de água total (CAT)

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

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

3.4.9. Massa seca (MS)

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

3.5. Determinação da atividade respiratória de embriões

Os embriões foram obtidos de sementes submetidas à mesma metodologia utilizada nos experimentos de germinação. Os embriões tiveram sua atividade respiratória determinada 24h após a semeadura, utilizando eletrodo de oxigênio tipo Clark, inserido na câmara de acrílico e conectado a um polarógrafo.

Trinta miligramas de embriões seccionados foram removidos das sementes utilizando tesoura e pinça cirúrgica e inseridos imediatamente na câmara de acrílico contendo 2mL de solução nutritiva (COPELAND & LIMA, 1992), (pH 5,8). A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em nmoles de oxigênio consumidos por minuto relacionada à massa fresca de embriões (g), inserida na câmara de acrílico. A concentração de oxigênio dissolvido no meio de incubação foi de 240 μ M, a 25°C.

Na determinação da respiração mitocondrial via citocromo-oxidase, da respiração via oxidase alternativa e respiração devida a oxidases extramitocondriais utilizou-se o cianeto de potássio (KCN) (250 μ M) como inibidor do complexo IV e como inibidor da oxidase alternativa utilizou-se o ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

3.6. Isolamento de mitocôndria

O isolamento das mitocôndrias foi realizado de raízes primárias de *E. heterophylla* crescidas por 48h após a semeadura, em gerbox de coloração preta mantidos no escuro em BOD.

Vinte gramas de raízes (aproximadamente 4000 plântulas) das plântulas foram lavadas em água destilada e tiveram sua raiz primária seccionada em segmentos de 1 cm e então colocadas em 60 ml de meio de extração contendo manitol 0,4 M, Tris-HCl (pH 7,2) 50mM, EDTA 1,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM, cisteína 0,1% (p/v) e albumina bovina (BSA) livre de ácidos graxos 0,5% (p/v). O material obtido foi homogeneizado por 10s, com auxílio de desintegrador (modelo van Potter-Elvehjem) e filtrado através de várias camadas de gaze. A solução teve seu pH ajustado para 7,2 com adição de KOH e então centrifugado a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante contendo as mitocôndrias foi centrifugado novamente a 15.000 x g por 10 minutos. O sedimento resultante deste processo foi suspenso em 2 mL de meio constituído de manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, HEPES (pH 7,2) 20 mM e albumina bovina (BSA) livre de ácidos graxos 0,2% (p/v). Os procedimentos citados acima foram todos realizados em temperatura de 0-4 °C (KERN *et al.*, 2009).

3.7. Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de *Euphorbia heterophylla* L.

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas foi medido polarograficamente, a 25°C, como foi descrito para a respiração de embriões. O meio de reação contendo manitol 0,4M, KH_2PO_4 5,0mM, MgCl_2 5,0mM, albumina bovina livre (BSA) de ácidos graxos 1,0% (p/v), Tris-HCl (pH 7,2) 10mM, DMSO 2% e óleo essencial de *C. winterianus* (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03 e 0,06% (v/v)) foi adicionado à câmara de acrílico de acordo com o tratamento a ser avaliado. Adicionaram-se quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciaram-se pela adição de L-malato 10 mM + NAD^+ 50 mM ou NADH 1,0 mM. Monitorou-se o consumo de oxigênio por aproximadamente 5 minutos, representando a respiração basal. Adicionou-se então 160 μM de ADP iniciando a respiração do estado III. O estado IV da respiração foi considerado como o consumo de oxigênio após a exaustão do ADP adicionado. A razão ADP/O e o controle respiratório foram calculados de acordo com Chance & Williams (1955). Para a discriminação da respiração via citocromo-oxidase (COX) e respiração via oxidase alternativa utilizou-se o inibidor KCN 1 mM (KERN *et al.*, 2009).

3.7.1. Determinação do teor de proteínas

Na determinação do teor de proteínas foram utilizados o reativo A (30 mg de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH em 1000 mL de H_2O destilada), o reativo B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 2%), o reativo C (tartarato de sódio a 4%) e o reativo D (reagente de Folin Ciocalteu 1 N).

As suspensões foram diluídas 20 vezes; as soluções foram misturadas no dia do experimento na ordem e volume de 0,2 mL de reativo B, 0,2 mL de reativo C e 20 mL de reativo A. Os tubos de ensaio foram rotulados em triplicata, adicionando-se 0,1 mL da suspensão e 1 mL da mistura dos reativos. Os controles são constituídos de um branco, com a adição de 0,1 mL de água e um padrão, com a adição de solução de albumina a 20 % (m/v).

Os tubos foram agitados vigorosamente e após 10 minutos em temperatura ambiente adicionou-se 0,1 mL do reativo D. Após 10 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 700 nm contra o branco.

A concentração de proteína foi calculada com base na absorbância encontrada no padrão de albumina 20 % (m/v) de acordo com Lowry *et al.* (1951).

3.8. Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado variando de 5 a 6 concentrações do óleo essencial de *C. winterianus* e três espécies testadas (*E. heterophylla*, *I. grandifolia* e *G. max*). Foram utilizadas 4 repetições para as espécies *E. heterophylla* e *I. grandifolia* e 8 repetições para *G. max*. Os dados foram submetidos a ANOVA e as variáveis significativas analisadas por regressão polinomial com nível de significância de 5% pelo programa SISVAR (5.1). Os efeitos do óleo essencial nas três espécies foram analisados separadamente. Os gráficos foram feitos pelo programa GRAPHPAD PRISM (versão 5.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do óleo essencial nas variáveis de germinação

Observa-se pelos resultados que o óleo de *C. winterianus* influenciou significativamente a germinação e as outras variáveis quantitativas da germinação das três espécies estudadas (Figuras 1, 2 e 3). A porcentagem de germinação (PGER) das três espécies foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial.

A concentração do óleo essencial para a inibição de 50% da germinação (DL50) foi diferente para as três espécies, quando comparado com o controle (DMSO, 2%) (Figura 1A, 2A e 3A). As DL50 encontradas para *E. heterophylla*, *I. Grandifolia* e *G. max* foram de 0,06, 0,08 e 0,105%, respectivamente, indicando forte efeito inibitório e/ou alelopático na germinação das espécies estudadas, em especial para o *E. heterophylla* (Figuras 1A, 2A e 3A). A DL50 maior para a soja sugere que no caso da aplicação do óleo em nível de campo, com finalidade herbicida, essa ação pode afetar menos a soja do que o leiteiro e a corda-de-viola. Obviamente outros testes devem ser feitos, especialmente no solo, para que se obtenham dados mais confiáveis e de maior aplicabilidade. Marco *et al.* (2004) verificaram que a dose de 0,25% do óleo de citronela foi capaz de inibir 100% a germinação em *Chloris barbata* (capim-branco). Já Borges *et al.* (2004) e Vieira *et al.* (2004) obtiveram 100% de inibição da germinação de *Emilia sonchifolia* (falsa-serrralha) e de *Abelmoschus esculentus* (quiabo), respectivamente em concentração de 0,5% ou superiores.

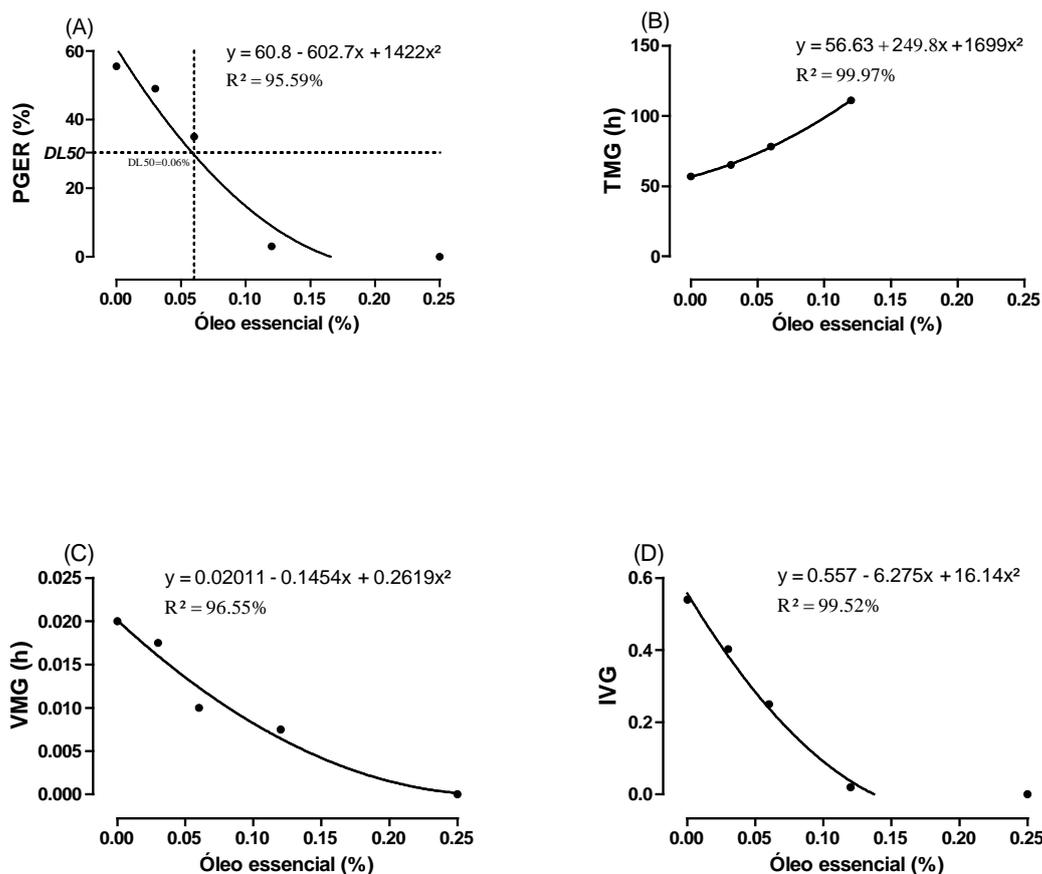


Figura 1 – Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla*, UEM, Maringá – PR, 2010.

O tempo médio de germinação (TMG) observado representa o tempo que as sementes levaram para germinar em função da concentração do óleo essencial (Figuras 1B, 2B e 3B). Observa-se que o TMG foi crescente, em todas as espécies até a concentração de 0,12%. Acima desta concentração, especialmente na concentração de 0,25% as sementes não germinaram o que explica a ausência do ponto na Figura 1B referente à concentração.

O TMG observado nas três espécies estudadas aumentou mais de 50%, alterando o tempo médio de germinação de 50h para mais de 100h (Figuras 1B, 2B e 3B). Resultados significativos foram encontrados por Marco *et al.* (2004) em relação ao TMG utilizando óleo essencial de citronela sobre capim-branco.

Os dados de TMG fornecem não apenas dados quantitativos, mas também qualitativos, pois o aumento em TMG denuncia problemas metabólicos no processo

germinativo. Estes resultados demonstram que o óleo essencial pode estar interferindo em alguns processos metabólicos bem como na respiração. Sob o ponto de vista agrônomo, o aumento do TMG reduz a viabilidade das sementes de se desenvolverem até a fase adulta, pois ficam mais tempo expostas aos microrganismos patogênicos presentes no solo, além de reduzir substancialmente a capacidade competitiva por água e posteriormente minerais destas plântulas em relação a plântulas sem este tratamento, indicando vigor reduzido quando comparado ao controle (FERREIRA & BORGUETTI, 2004).

A velocidade média de germinação (VMG) indica a velocidade de germinação das sementes estudadas. Novamente aqui observa-se que o aumento na concentração do óleo essencial reduziu drasticamente a VMG. Este comportamento foi semelhante nas três espécies estudadas; entretanto, percebe-se que o coeficiente angular da regressão polinomial para a soja foi menor quando comparado com as duas invasoras. Na prática significa que a soja teve a VMG menos afetada do que as outras espécies. É possível que a soja seja mais tolerante à presença do óleo essencial ou, ainda, que tenha absorção do óleo essencial menos acentuada.

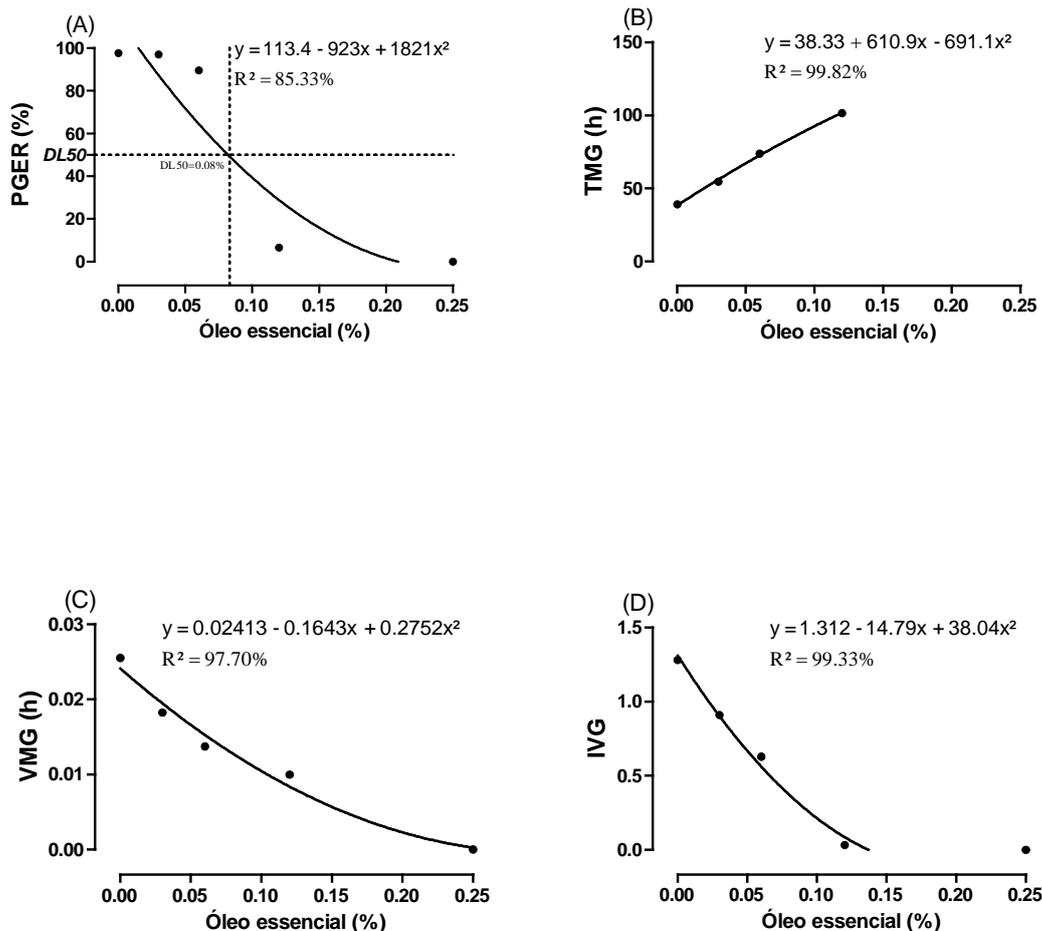


Figura 2 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *I. grandifolia*, UEM, Maringá – PR, 2010.

O índice de velocidade de germinação (IVG) também a semelhança do VMG foi influenciado pelo óleo essencial. Nas espécies daninhas os valores de IVG tendem a zero em concentração mais baixa (0,14%) do óleo essencial, enquanto que para a soja o IVG tendeu a zero em concentração maior (0,18%) do óleo essencial. Estes resultados indicam que as sementes de soja podem suportar concentrações maiores do óleo essencial quando comparada às espécies de plantas daninhas estudadas.

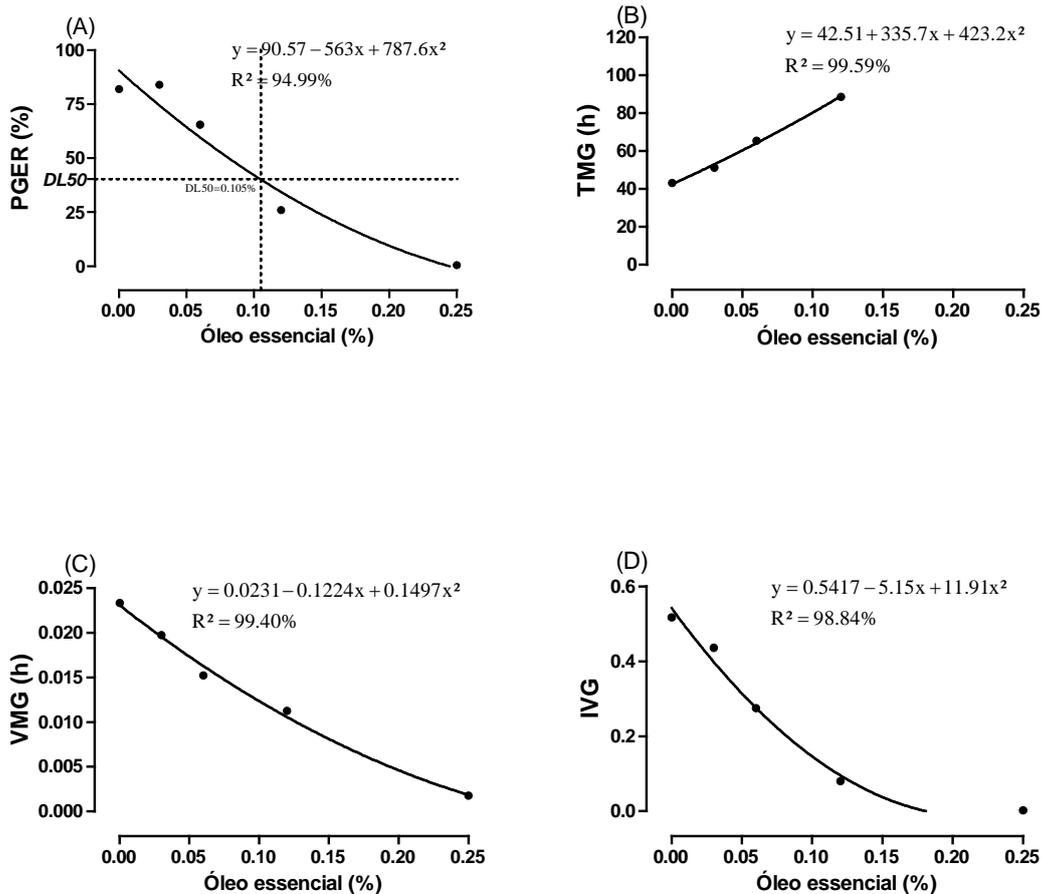


Figura 3 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na porcentagem de germinação (PGER), no tempo médio de germinação (TMG), na velocidade média de germinação (VMG) e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *G. max*, UEM, Maringá – PR, 2010.

De acordo com as variáveis analisadas anteriormente pode-se verificar que o óleo essencial influencia tanto o processo germinativo em termos absolutos (número total de sementes germinadas) quanto à cinética do processo germinativo (efeito qualitativo). Disso decorre que algum ou alguns dos componentes (efeito isolado ou efeito sinérgico) do óleo essencial podem estar interferindo em alguns processos embrionários de forma letal, como por exemplo no processo respiratório (LORBER & MULLER, 1976), impedindo a germinação das sementes, com maior ênfase nas duas invasoras, mesmo em baixas concentrações. Ou também, estes componentes poderiam retardar a degradação e/ou mobilização de reservas do endosperma para o embrião tornando a germinação um processo mais moroso e em termos práticos até letal para as sementes.

Segundo Singh *et al.* (2005) a severidade dos sintomas ocasionados pelo óleo de *E. citriodora*, que tem como composto majoritário o citronelal, pode estar associada à capacidade dos óleos em romper a integridade da membrana, resultando no aumento da permeabilidade da membrana e vazamento de solutos. Assim, o aumento na permeabilidade da membrana pode acarretar injúrias celulares inviabilizando a germinação das sementes. Além disso, Lorber & Muller (1976) verificaram que terpenos voláteis podem danificar mitocôndrias e assim prejudicar negativamente a respiração e o metabolismo energético, o que também pode ter contribuído aqui para a baixa percentagem de germinação e aumento nos valores de TMG.

4.2. Efeito do óleo essencial sobre as variáveis de crescimento

As variáveis biométricas de crescimento foram influenciadas pela presença do óleo essencial de citronela e a inibição ocorreu nas três espécies estudadas (Figuras 4, 5 e 6). Novamente neste caso, as duas plantas daninhas estudadas apresentaram maior inibição nos valores do comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), observados pelos valores mais negativos do coeficiente angular quando comparado com os valores da soja (Figuras 4A, 4B, 5A e 5B). Para a soja a inibição total dos valores de CPA e CSR pode ser observado em concentrações próximas a 0,25% (Figura 6A e 6B), enquanto para as plantas daninhas esta inibição foi observada em concentrações próximas a 0,15% do óleo essencial (Figuras 4A, 4B, 5A e 5B). O comprimento total (CT) que reflete a soma das variáveis CPA e CSR teve comportamento semelhante ao descrito anteriormente.

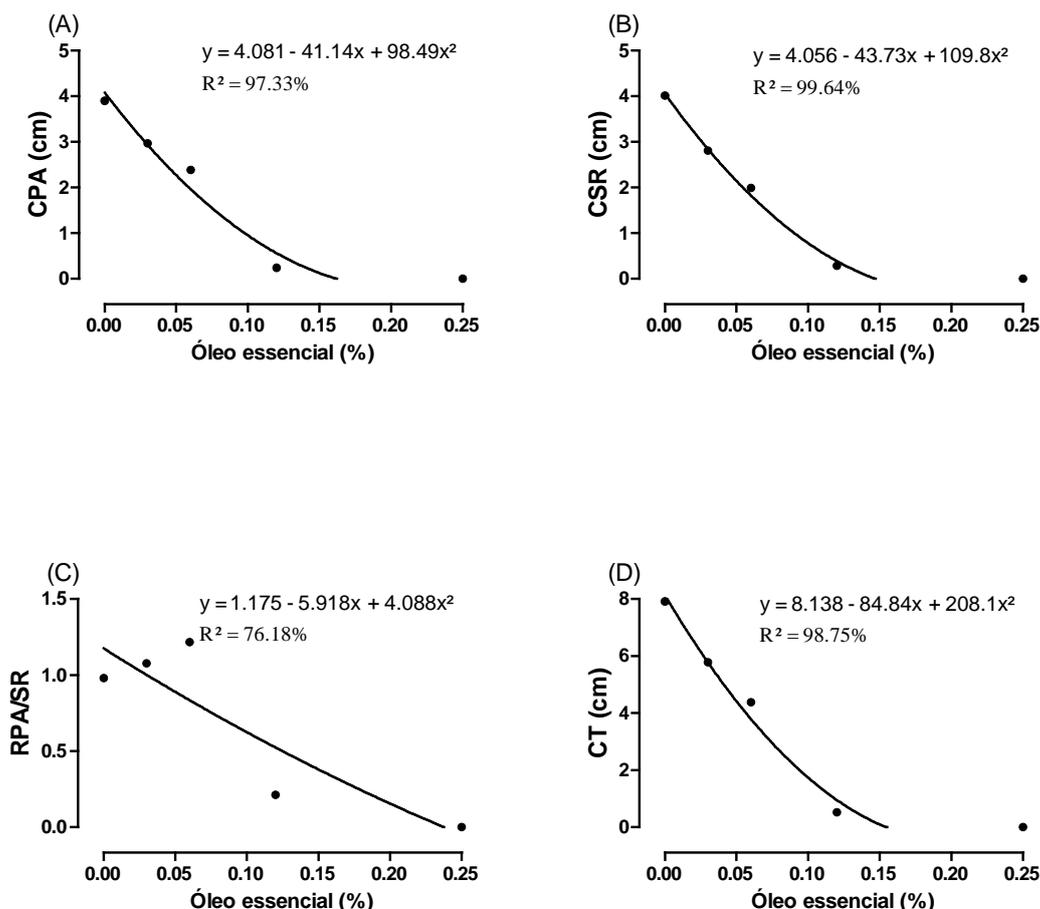


Figura 4 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *E. heterophylla*, UEM, Maringá – PR, 2010.

O crescimento de uma planta é o resultado da divisão celular e do alongamento celular (FERREIRA & BORGUETTI, 2004). Assim, qualquer interferência em um ou em ambos os processos compromete o crescimento das plantas. Neste caso, o óleo essencial pode ter afetado a divisão celular e/ou o alongamento celular direta ou indiretamente, como observado por Gusman *et al.* (1994) que ao utilizar o citronelol (componente importante do óleo essencial de citronela) observou a inibição das variáveis biométricas - diâmetro do xilema do caule e câmbio vascular - e no teor de amido. Estes mesmos autores (GUSMAN *et al.*, 1990) verificaram também o efeito inibitório do citronelol volatilizado na mitose (30,5%) de *E. heterophylla*. Apesar de os resultados indicarem que um tal efeito possa ter ocorrido no presente estudo, não se pode afirmar com absoluta segurança, pois não foram obtidas evidências diretas nos

experimentos conduzidos. Experimentos envolvendo estas variáveis serão objetivos de futuros estudos.

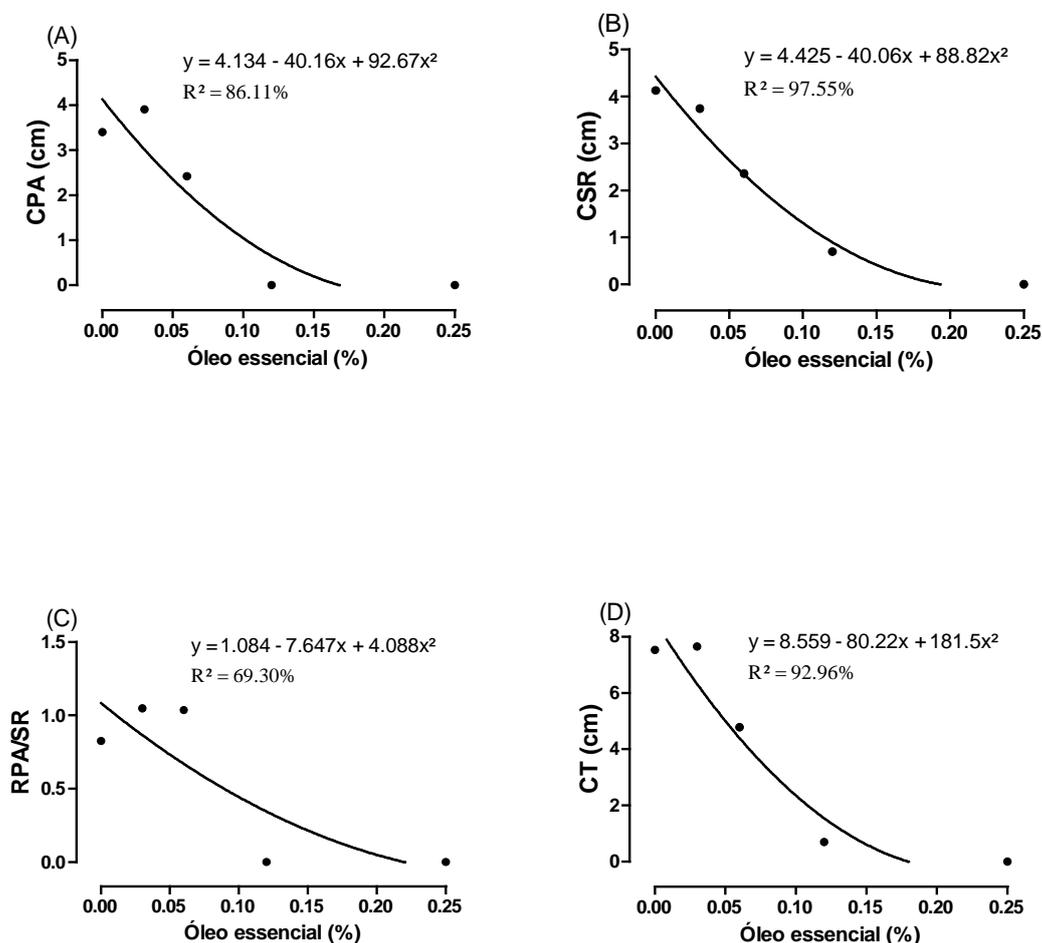


Figura 5 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *I. grandifolia*, UEM, Maringá – PR, 2010.

Os menores valores encontrados de CPA, CSR e CT e mesmo da relação RPA/SR podem ser o reflexo do retardamento no processo germinativo causado pelo óleo essencial, conforme descrito anteriormente (Figuras 1, 2 e 3). Também não se pode descartar o fato de o óleo essencial estar interferindo tanto no processo germinativo quanto em eventos pós-germinativos. Ootani (2010) observou efeito bioherbicida após aplicação do óleo essencial de citronela em plantas de *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), sendo os resultados significativos 24h após a aplicação. Tais resultados

indicam a existência de efeitos também no metabolismo das plantas adultas, e não apenas no processo de germinação. Desta forma, outros estudos já estão sendo programados para dirimir e esclarecer mais precisamente o efeito deste óleo essencial em plantas invasoras e de culturas de lavouras.

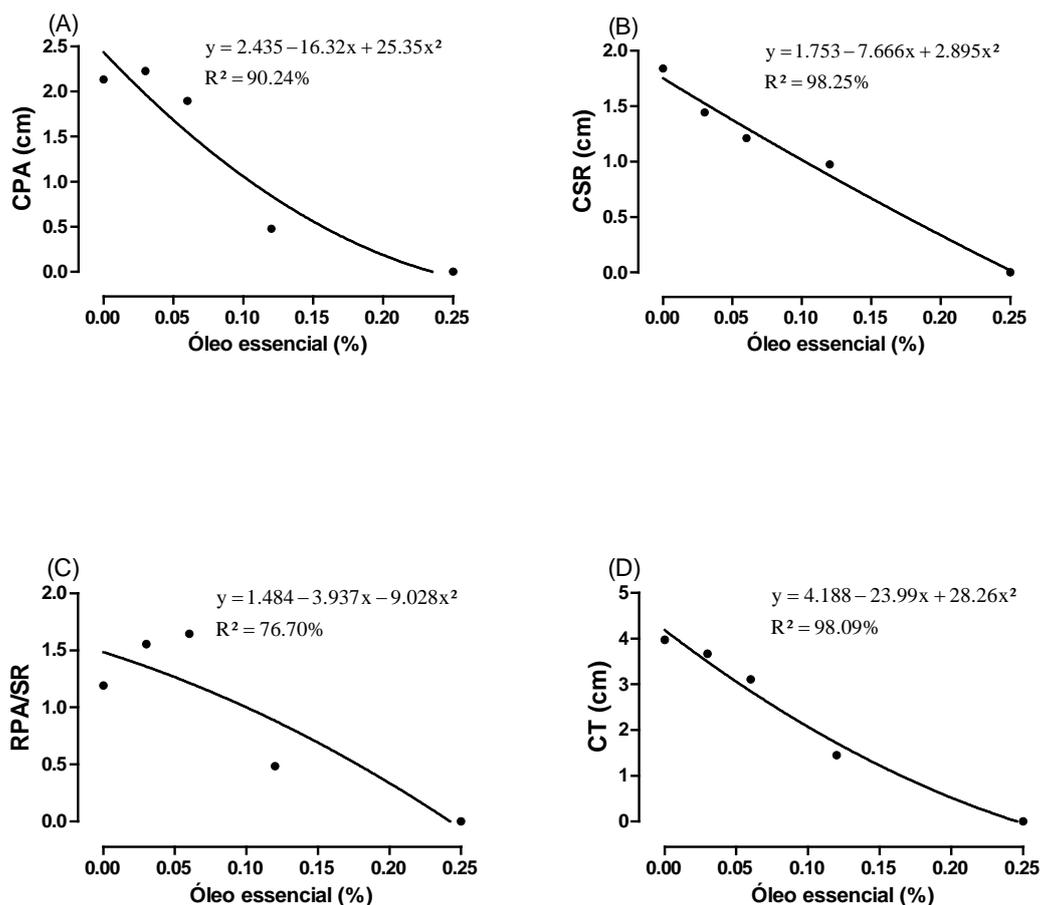


Figura 6 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), na relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) e no comprimento total (CT) das plântulas de *G. max*, UEM, Maringá – PR, 2010.

A relação parte aérea/sistema radicular (RPA/SR) decresceu e tendeu a zero com o aumento da concentração do óleo essencial nas três espécies estudadas (Figuras 4C, 5C e 6C). Além disso, o crescimento da parte aérea foi mais inibido do que o do sistema radicular. O contato das raízes com o óleo essencial deve ter acarretado injúria celular. Estas injúrias podem diminuir a absorção de água e/ou de elementos minerais e, em

consequência, o transporte destes componentes para a parte aérea. A limitação de água e elementos minerais proporciona menor crescimento da parte aérea.

Os valores de biomassa seca, melhor do os valores de biomassa fresca, explicam os efeitos alelopáticos inibitórios do óleo essencial. A biomassa fresca, embora neste caso tenha demonstrado a mesma tendência no acúmulo da biomassa seca (dados não mostrados), é uma variável que está sujeita a interferências por fatores abióticos que influenciam significativamente na transpiração e, por conseguinte, nos valores de biomassa fresca. Por outro lado, a avaliação do efeito fitotóxico da citronela pelo acúmulo de biomassa é mais confiável e representa melhor o que ocorreu no metabolismo das plântulas.

A variação de biomassa foi profundamente afetada pelo aumento da porcentagem de óleo essencial de citronela em todas as espécies estudadas (Figuras 7, 8 e 9). A massa seca da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSR) e total (MST) foi reduzida já em concentrações relativamente baixas. Nesta variável observa-se que a *E. heterophylla* foi mais sensível em relação a outras espécies, apresentando valor estimado igual a zero na concentração de 0,14%, enquanto para *I. grandifolia* e *G. max* os valores obtidos foram de 0,25% (Figuras 7C, 8C e 9C). Fica aqui patente que a *E. heterophylla* é mais afetada pelo óleo essencial quanto ao acúmulo de massa seca da raiz em relação às outras espécies. Gusman *et al.* (1994) utilizando o citronelol (principal constituinte do capim-citronela), verificaram acentuada redução de matéria seca, área foliar específica e crescimento de hipocótilo de plantas de *E. heterophylla* a nível de campo. Os autores relatam ainda que os danos causados às plantas de *E. heterophylla* submetidas ao tratamento foram irreversíveis.

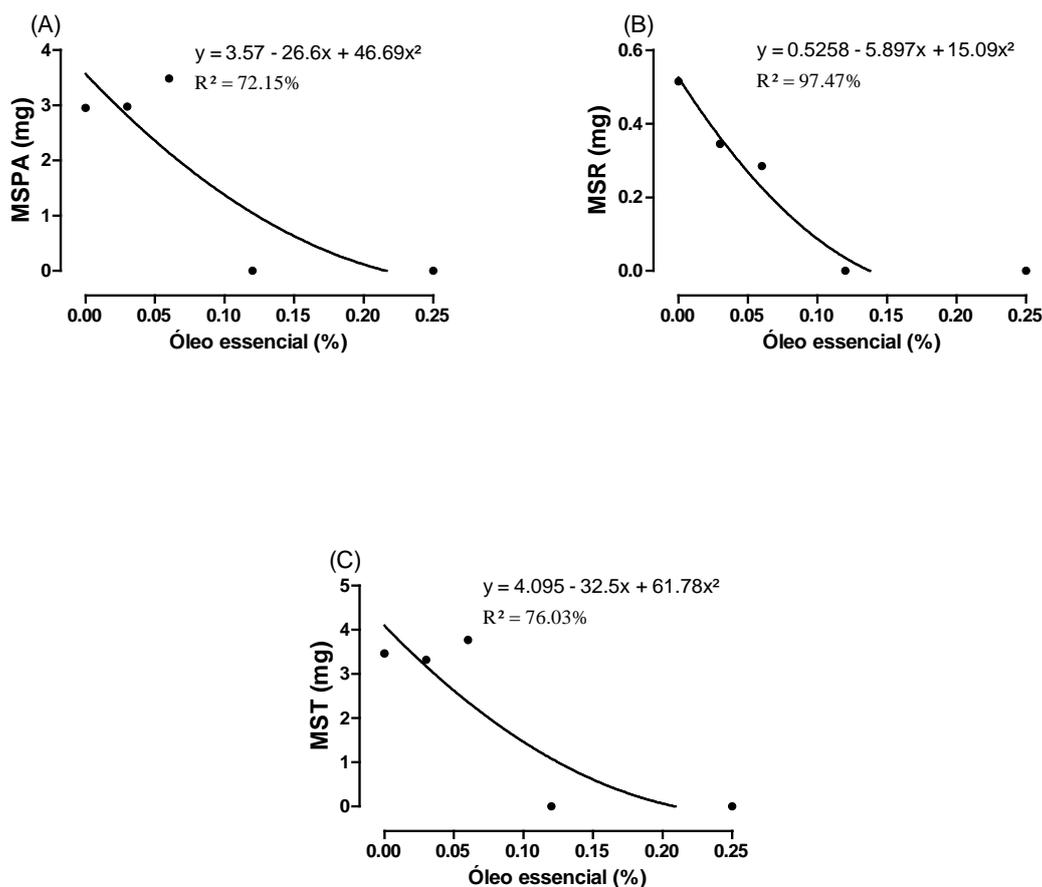


Figura 7 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de *E. heterophylla*, UEM, Maringá – PR, 2010.

Ootani (2010) observou que a utilização do óleo essencial de citronela reduziu significativamente os valores de MSPA e de MSR de plantas de *Digitaria horizontalis* (capim-colchão) e *Cenchrus echinatus* L. (capim-carrapicho) em relação ao controle. Neste caso, o uso do óleo essencial apresentou efeitos mais significativos do que aqueles do principal constituinte, o citronelal. Assim, a interação entre os compostos presentes no óleo essencial pode apresentar sinergismo. Observou-se a morte das plantas 24h após a aplicação de soluções contendo 20% de citronelal ou óleo essencial de citronela. Os sintomas de fitotoxicidade iniciaram em menos de 1h após a aplicação dos tratamentos, evidenciando a potencialidade bioherbicida destes compostos.

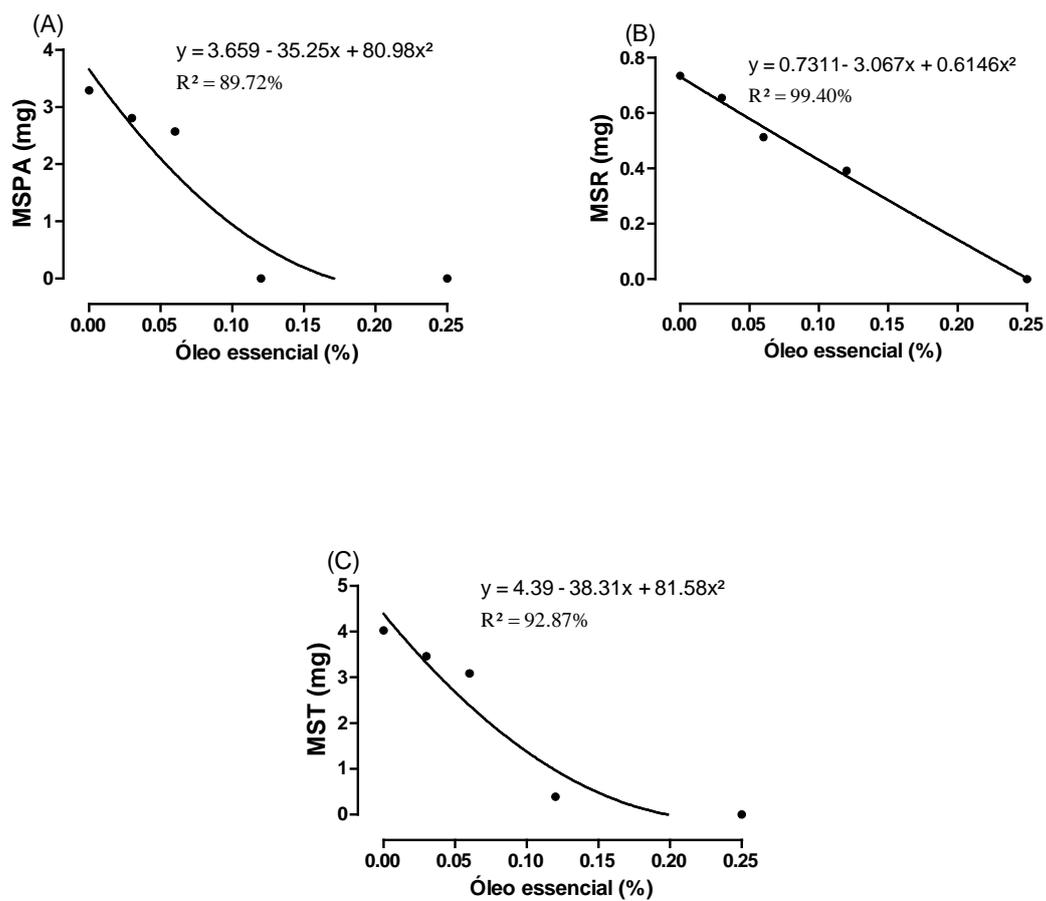


Figura 8 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de *I. grandifolia*, UEM, Maringá – PR, 2010.

A redução no acúmulo de biomassa em todas as espécies e em todas as partes das plantas sugere que o óleo essencial pode estar envolvido em injúrias celulares e/ou metabólicas (LORBER & MULLER, 1976; SINGH, 1995).

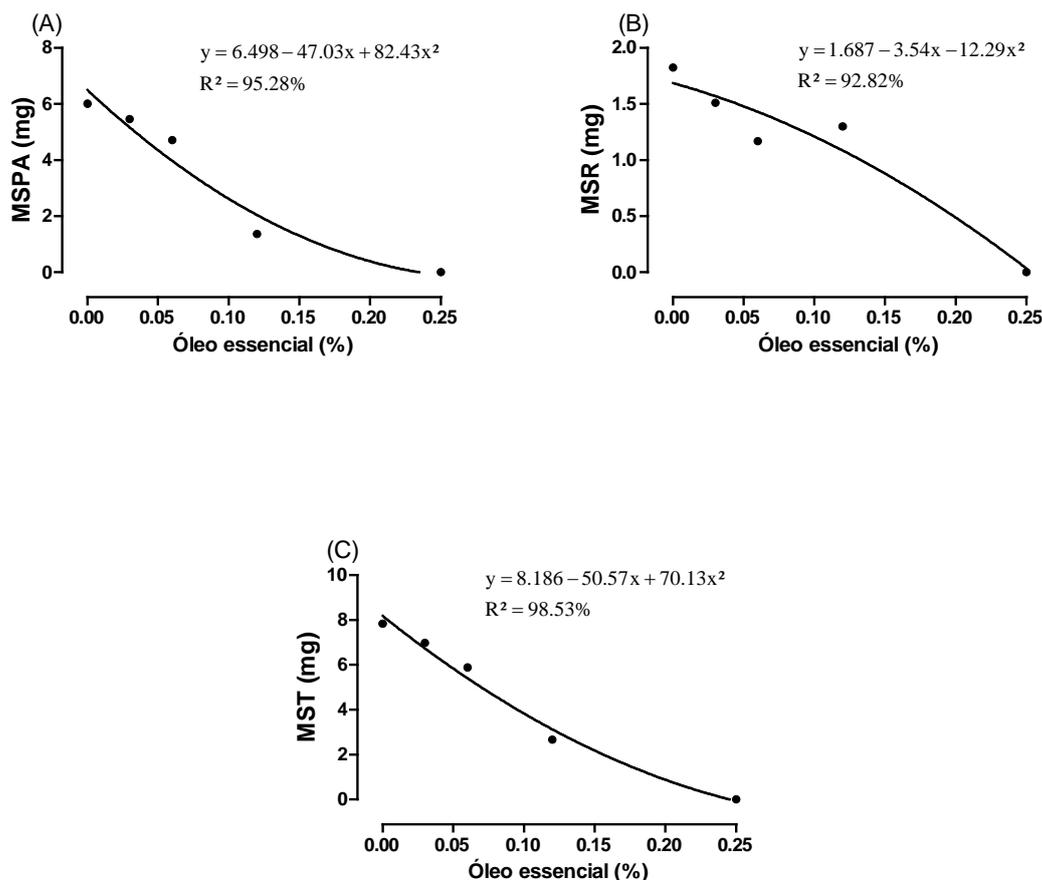


Figura 9 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de *G. max*, UEM, Maringá – PR, 2010.

Através das equações polinomiais para o conteúdo de água da parte aérea (CAPA), da raiz (CAR) e total (CAT), é possível perceber que o conteúdo de água atingiu valores próximos a zero em concentração bem baixas do óleo essencial (Figuras 10, 11 e 12). Aparentemente, a *E. heterophylla* foi a espécie mais afetada (Figura 10) e a soja a mais tolerante (Figura 12). No caso do leiteiro, o conteúdo de água da raiz (CAR - Figura 10B) foi mais reduzido do que o da parte aérea (CAPA - Figura 10A). No caso das outras duas espécies o comportamento foi o contrário (Figuras 11A, 11B, 12A e 12B).

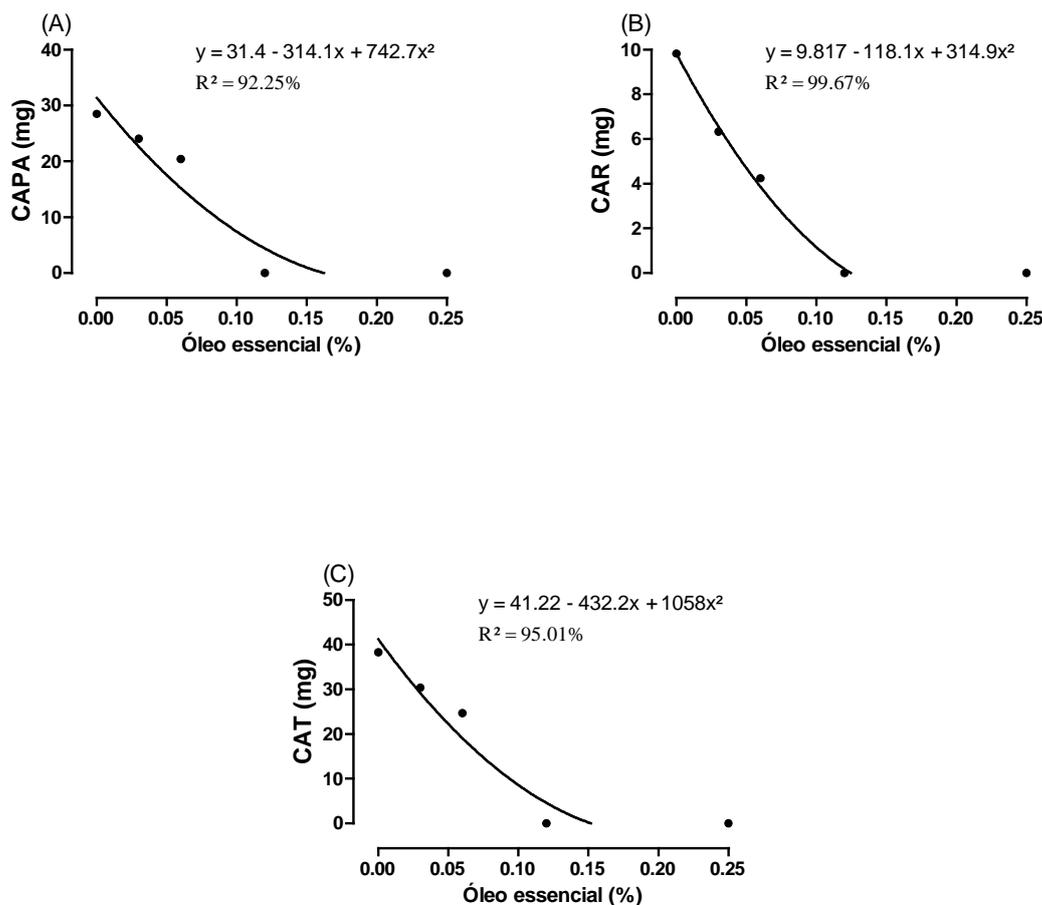


Figura 10 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR) e conteúdo de água total (CAT) de *E. heterophylla*, UEM, Maringá – PR, 2010.

O fato do conteúdo de água, em ambas as partes da planta, ser menor à medida que se adicionou maior percentagem de óleo essencial pode indiretamente sugerir que o óleo pode estar interferindo no metabolismo celular. Sabe-se que a água é de fundamental importância nas reações enzimáticas, na integridade de membrana e em outros processos metabólicos. Assim, a redução no conteúdo de água poderia estar afetando principalmente o metabolismo primário das plantas, como por exemplo a respiração (Figuras 13, 14 e 15). Entretanto, estes dados não são suficientes para concluir se a absorção foi verdadeiramente afetada.

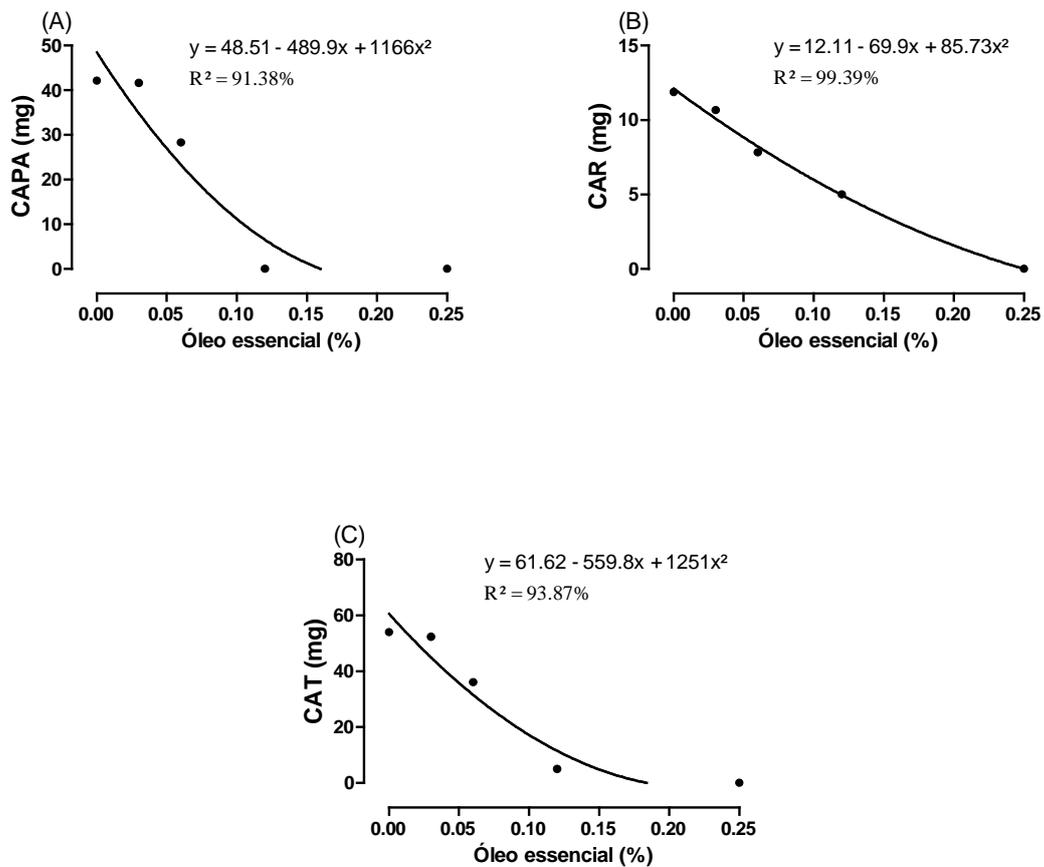


Figura 11 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), conteúdo de água da raiz (CAR) e conteúdo de água total (CAT) de *I. grandifolia*, UEM, Maringá – PR, 2010.

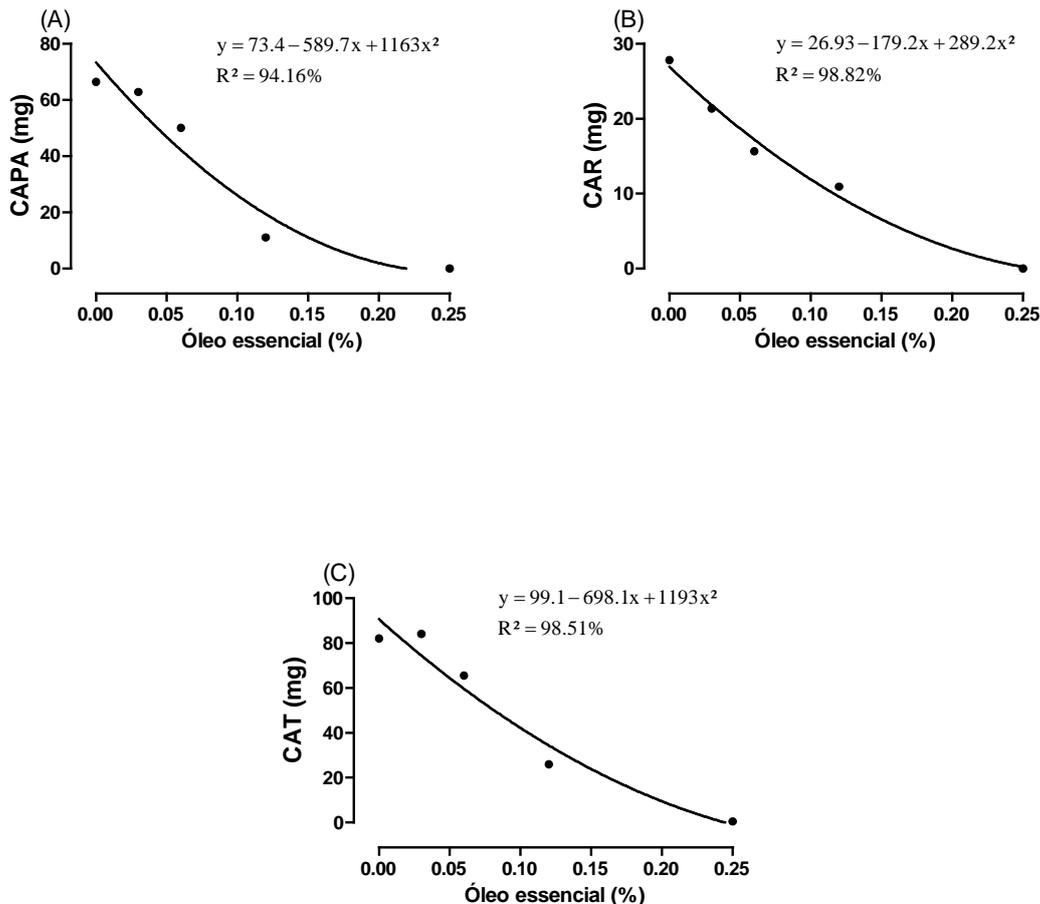


Figura 12 - Regressão polinomial do efeito do óleo essencial de *C. winterianus* no conteúdo de água da parte aérea (CAPA), teor de água da raiz (CAR) e teor de água total (CAT) de *G. max*, UEM, Maringá – PR, 2010.

4.3. Efeito do óleo essencial na respiração

As Figuras 13 A, B e C apresentam a respiração de embriões das três espécies estudadas. A taxa de consumo de oxigênio total (TOTAL), medida na ausência dos inibidores SHAM e KCN no meio de reação, representa a taxa de respiração total dos embriões analisados (BINGHAM & FARRAR, 1987). A respiração na presença do SHAM representa o consumo de O_2 pela cadeia transportadora de elétrons normal (oxidase normal) e pelas peroxidases extra-mitocondriais (baixa atividade). A respiração na presença de KCN representa o consumo de O_2 da cadeia transportadora alternativa (oxidase alternativa).

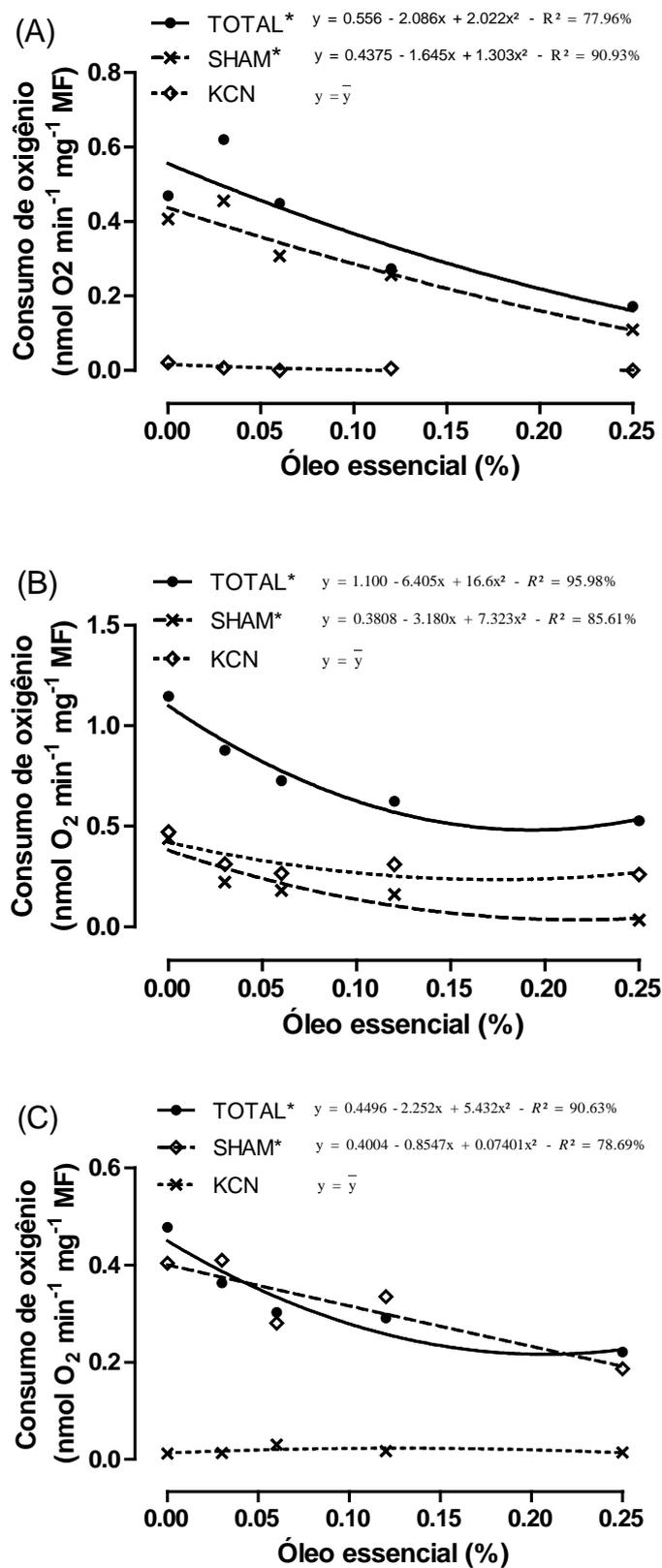


Figura 13 - Equação de regressão da respiração total, respiração na presença de SHAM e a respiração insensível ao KCN em função do aumento na concentração do óleo essencial de *C. winterianus* em embriões de *E. heterophylla* (A), *I. grandifolia* (B) e *G. max* (C) embebidos durante 24h, UEM, Maringá – PR, 2010.

Tanto a respiração total quanto a respiração na presença do inibidor SHAM (respiração sensível ao cianeto) foram afetadas pelo óleo essencial da citronela (Figuras 13A, B e C) em todas as espécies estudadas. Deve-se ressaltar que os efeitos aqui descritos representam as injúrias crônicas causadas pelo óleo essencial, que é o resultado da exposição dos embriões por 24h à concentrações crescentes do óleo essencial.

Pelas equações percebe-se nitidamente que a taxa de respiração dos embriões foi inibida e esta inibição foi diretamente proporcional à concentração de óleo essencial aplicada nas três espécies estudadas (Figuras 13 A, B e C). A taxa de respiração residual na presença de KCN foi irrelevante nas três espécies, não apresentando diferença significativa em nenhuma espécie estudada. A baixa taxa de consumo de O₂ na presença do inibidor KCN indica que a respiração total é representada basicamente pelo consumo de O₂ da cadeia transportadora de elétrons normal (oxidase normal) e pela cadeia transportadora de elétrons alternativa (oxidase alternativa).

Os resultados aqui apresentados se assemelham aos obtidos para as variáveis de germinação e de crescimento. Sabe-se que a respiração é um processo metabólico fundamental para as plantas sendo a principal via de oxi-redução para disponibilizar esqueletos carbônicos e energia para o metabolismo celular, transporte e assimilação de íons necessários aos processos de manutenção e de crescimento (TAIZ & ZERINGER, 2009). Desta forma, é possível que o óleo de citronela tenha afetado direta ou indiretamente a produção de energia e/ou de esqueletos carbônicos das espécies estudadas. Obviamente, o menor suprimento energético e de esqueletos carbônicos comprometem todo o metabolismo podendo interferir, como descrito anteriormente, nos processos germinativos e pós-germinativos. Além disso, a baixa taxa respiratória pode afetar sobremaneira a divisão e o alongamento celular o que explicaria, pelo menos em parte, os resultados obtidos com respeito ao efeito do óleo essencial nas variáveis biométricas das espécies estudadas.

O fluxo de elétrons pela rota citocromo possibilita a formação do gradiente eletroquímico requerido para a produção de ATP a partir do ADP + Pi pelo complexo ATP sintase. A interferência progressiva do óleo essencial no fluxo de elétrons desta rota sugere que este elemento esteja reduzindo o suprimento energético (ATP) (CUMMING *et al.*, 1992) ou, ainda, reduzindo o consumo de ATP do sistema radicular. Além disso, percebe-se que estes terpenos tiveram também efeito na rota oxidase alternativa, o que pode ser visualizado pela área entre a respiração total e a respiração

sensível ao SHAM (valor da respiração total subtraído do valor da respiração na presença do SHAM) (Figuras 13 e 14). Neste caso, as injúrias causadas na oxidase alternativa poderiam, de alguma forma, prejudicar a função termogênica desta rota e contribuir significativamente para o aumento no estresse oxidativo celular das espécies estudadas. Entretanto, é provável que a inibição do consumo de oxigênio pela rota alternativa possa ser decorrente da ação do óleo essencial no fluxo de elétrons da rota citocromo. Todavia, o menor fluxo tanto para a rota citocromo quanto para a rota alternativa sugere influência do óleo essencial na rota propriamente dita ou em uma etapa comum para ambas as vias como a produção de substratos, ou ainda na oxidação desses substratos.

Acredita-se que os valores quase sempre menos inibitórios na soja em relação às plantas daninhas possam ser parcialmente explicados pelo fato de essa espécie poder manter níveis mais elevados de produção de energia e de esqueletos carbônicos para manter o crescimento em maiores taxas e/ou ter maior capacidade de alocar a energia metabólica para o processo de crescimento do que as invasoras. Neste caso, a soja poderia também direcionar parte de seu suprimento metabólico de crescimento para o processo de manutenção e manter o custo energético causado pelo efeito fitotóxico do óleo essencial.

Ao contrário do experimento anterior em que as sementes foram pré-tratadas com o óleo essencial, neste experimento, o óleo foi adicionado diretamente à mistura de reação contendo mitocôndrias isoladas de raízes provenientes de plântulas de *E. heterophylla* na presença do substrato NADH (Figuras 14 A) ou de L-malato (Figura 14 B). A análise da atividade respiratória de mitocôndrias isoladas foi feita apenas para a planta daninha *E. heterophylla*, que pelos dados anteriores apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial (Figura 13 A).

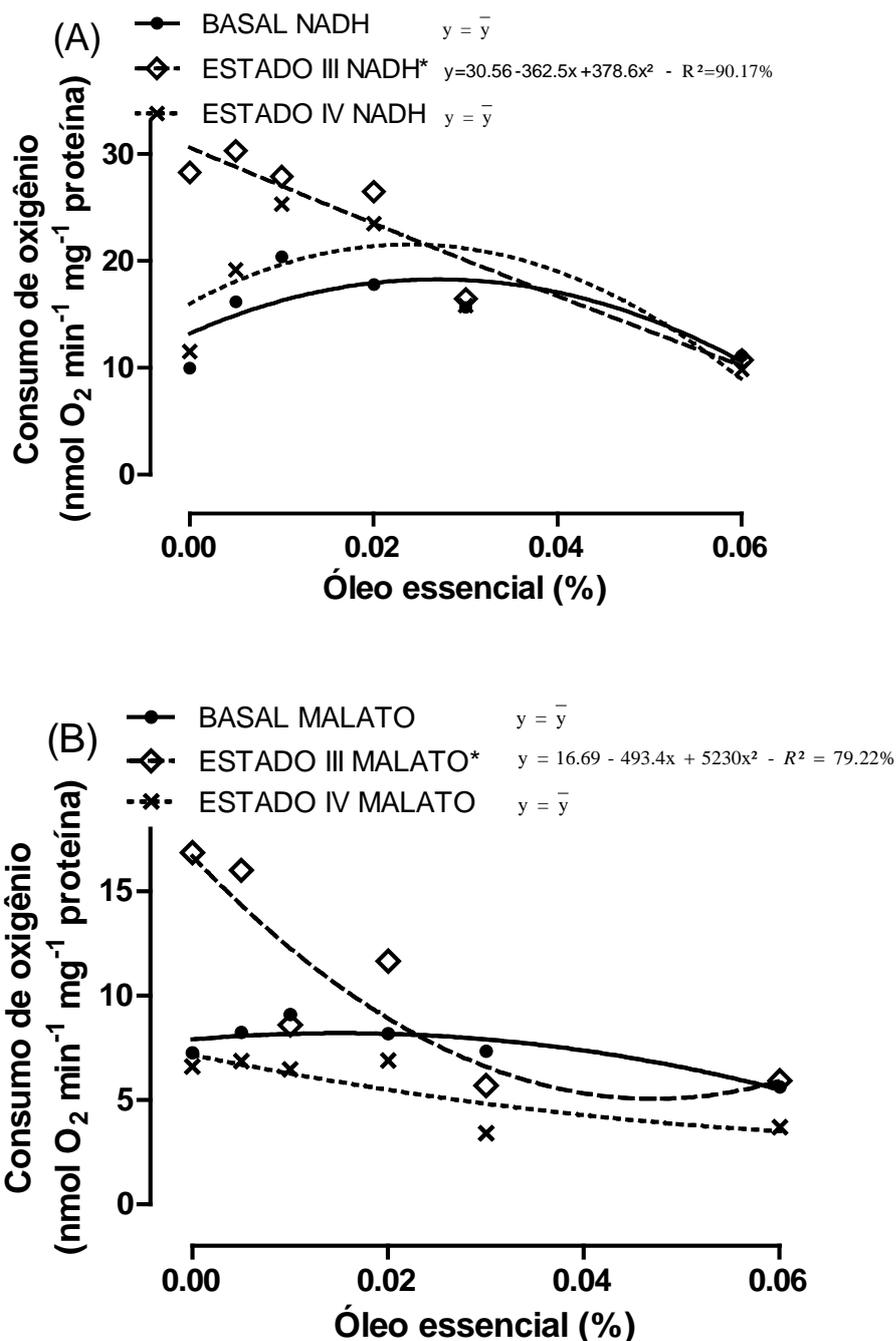


Figura 14 – Equação de regressão do consumo de O₂ no estado basal, estado III e estado IV de mitocôndrias isoladas de *E. heterophylla* na presença de NADH (A) e L-malato (B), em função do aumento na concentração do óleo essencial de *C. winterianus* no meio de reação, UEM, Maringá – PR, 2010.

Observa-se que a respiração acoplada à fosforilação do ADP (estado III) foi drasticamente inibida com o aumento da concentração do óleo essencial no meio de

reação independentemente do substrato utilizado (Figura 14 A e B). Da mesma forma, a relação ADP/O reduziu drasticamente independentemente do substrato utilizado (Figura 15). Já o estado basal e o estado IV (Figura 14 A e B) não variaram significativamente com o aumento na concentração do óleo essencial. Neste caso, o óleo essencial parece não estar afetando diretamente a cadeia transportadora de elétrons, uma vez que a oxidação dos substratos durante a respiração no estado 4 (com L-malato ou NADH) não foram inibidas significativamente (Figura 14 A e B). Aparentemente, o óleo interfere, de algum modo, na respiração acoplada à fosforilação oxidativa propriamente dita, podendo ser, dentre outros fatores, sobre o complexo ATP sintase e/ou no suprimento de adenilatos, como por exemplo na quantidade de ADP (PFEFFER *et al.*, 1986; CUMMING *et al.*, 1992) que chega até a matriz mitocondrial e é capaz de ser fosforilado ou, ainda, na quantidade de esqueletos carbônicos que chegam ao interior mitocondrial (COLLIER *et al.*, 1983).

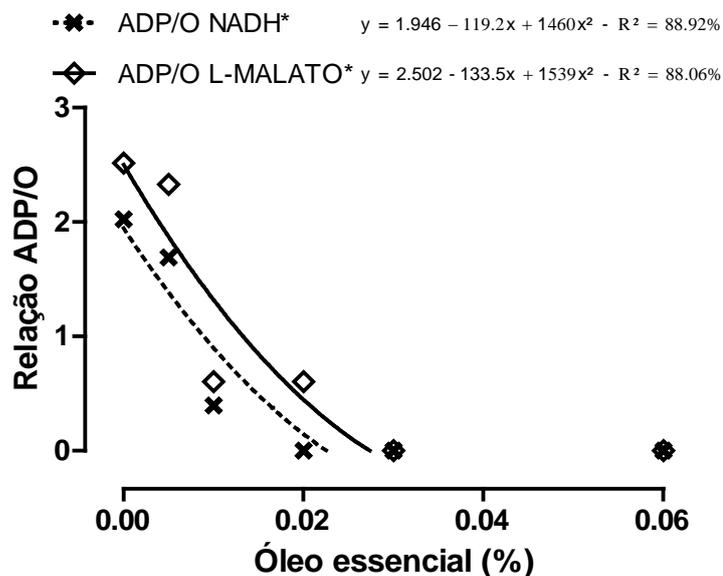


Figura 15 – Equação de regressão da relação ADP/O de mitocôndrias isoladas de *E. heterophylla* na presença de NADH ou L-malato, em função do aumento na concentração do óleo essencial de *C. winterianus* no meio de reação, UEM, Maringá – PR, 2010.

Dos resultados apresentados até aqui, algumas considerações podem ser feitas no sentido e elucidar e compreender algumas questões. O fato de o óleo essencial alterar o

metabolismo respiratório geral, bem como o mitocondrial no caso da *E. heterophylla*, o que provavelmente é verdadeiro também nas outras duas espécies, sugere que boa parte das inibições ocasionadas nas variáveis estudadas se deve à interferência do óleo (ou de seus constituintes) no metabolismo energético e talvez em nível de membrana (pelo menos para microrganismos). Isto parece ser verdade uma vez que tanto a germinação quanto o crescimento (alongamento e/ou divisão celular) foram afetados.

Quanto aos mecanismos de ação do óleo essencial podem-se fazer algumas considerações. Alguns dos efeitos do óleo essencial parecem atuar na permeabilidade da membrana embora os experimentos aqui executados não permitam maior precisão no comentário. Entretanto, alguns autores (KNOBLOCH *et al.*, 1989; DI PASQUA *et al.*, 2007) descrevem que os componentes majoritários de *C. nardus* e *E. citriodora* como o citronelal, geraniol e citronelol pertencem a um dos grupos de constituintes comumente presentes em óleos essenciais (terpenos) que, conhecidamente agem principalmente na permeabilidade e estrutura da membrana citoplasmática. Assim, a ação do óleo na descompartimentação da membrana poderia ser a causa da baixa taxa de germinação de sementes e também dos danos causados na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, o qual reduziu a taxa de consumo de oxigênio durante a fosforilação do ADP (estado III) bem como da respiração na presença do inibidor SHAM. Sendo assim, efeitos como perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, alteração no transporte de moléculas através da membrana, inibição de atividade de certas enzimas e conteúdo citoplasmático podem ser alguns mecanismos envolvidos na ação do óleo essencial nas plantas estudadas.

5. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *C. winterianus* afetou negativamente a percentagem de germinação (PGER), a velocidade média de germinação (VMG), o tempo médio de germinação (TMG) e o índice de velocidade de germinação (IVG) das plantas daninhas e da soja.

As equações polinomiais das variáveis de comprimento (CPA, CSR e CT), de biomassa (MSPA, MSR e MST) e conteúdo de água (CAPA, CAR e CAT) em função da concentração do óleo essencial demonstraram que o aumento do óleo essencial reduziu todos os valores das variáveis supracitadas nas três espécies.

Os valores do consumo total de oxigênio e de consumo na presença do inibidor SHAM (respiração sensível ao cianeto) foram afetados pelo pré-tratamento dos embriões com o óleo essencial nas três espécies. Neste caso, o óleo essencial de *C. winterianus* reduziu significativamente a fosforilação oxidativa mitocondrial de *E. heterophylla* medida pelo consumo de O₂ durante a fosforilação do ADP (estado III) e a relação ADP/O quando se utilizou o NADH ou L-malato como substrato respiratório. As outras variáveis - estado basal, estado IV e controle respiratório - não diferiram significativamente do controle.

A soja mostrou-se menos sensível ao óleo essencial de citronela em praticamente todas as variáveis avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; CUNHA, M. C. S. Métodos de superação de dormência em sementes de *Ipomoea* e *Merremia*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 21, n.2, p. 203-209, 2003.

BINGHAM, I. J.; FARRAR, J. F. Respiration of barley roots: Assessment of activity of the alternative path using SHAM. **Physiol. Plant.**, v. 70, p. 491- 498, 1987.

BORGES, N. S. S.; CORREA, M. L. P.; MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; SOMBRA, J. N. S. Óleos Essenciais de Capim Citronela e de Alecrim Pimenta na Germinação de Sementes de *Emilia sonchifolia*, (L.) D.C. **In Anais CBO**, 2004, disponível em < <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=3897>>. Acesso em: 07/12/2010.

BRASIL 2009. Soja em números (safra 2008/2009). Disponível em:<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17>. Data de acesso 05/12/2010.

CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. **Planta daninha** v. 28, n. 1 Viçosa 2010.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experimentes and modeling of *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. **J. Mex. Chem. Soc**, v,50(3), p. 126-129, 2006.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, abr-jun, 2010.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature** 175, 1120-1121. 1955.

CHIARADIA, V.; GRZEGOZESKI, L. P.; CANSIAN, R. L.; EMMERICH, D. J.; PAROUL, N. Composição química e atividade antioxidante da Citronela (*Cymbopogon winterianus*). **XVII encontro de química da região Sul**, FURG, 18 a 20 de novembro de 2009.

CLEMENTE, M. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; GOMES, F. T.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Research** v. 107, p. 987-992. 2010.

COLLIER, D. E.; ACKERMANN, F.; SOMERS, D. J.; CUMMINS J. R.; ATKIN, O. K. The effect of aluminum exposure on root respiration in an aluminum-sensitive and

aluminum-tolerant cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiol. Plant.**, v. 87, p. 447-452, 1983.

COPELAND, L. & LIMA, M. L. The effects of aluminium on enzymes activities in wheat roots. **J Plant Physiol** 140, 641-652, 1992

CORREA, M. L. P.; BEZERRA, A. P. L.; GUERRA, M. E. C.; OLIVEIRA, M. A. S.; SAMPAIO, M. C. A.; CALVET, A. S. F.; INNECCO, R. Efeito alelopático do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) sobre a germinação de sementes de picão-preto e de milho em diferentes épocas de aplicação. In **Anais CBO**, 2004, disponível em < <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=3930>>. Acesso em: 07/12/2010.

COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M.; FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.2., n.2, p.11-14, jun. 2008.

CUMMING, J. R.; CUMMING, A. B.; TAYLOR, G. F. Patterns of root respiration associated with the induction of aluminum tolerance in *Phaseolus vulgaris* L. **J. Exp. Bot.** v.43, p. 1075-1081, 1992.

DI PASQUA, R., BETTS, G., HOSKINS, N., EDWARDS, M., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal Agriculture. Food Chemical.** v.55, p.4863-4870, 2007.

DIAS, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, 2010. disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2010005000013&script=sci_arttext> acesso em: 08/12/2010.

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

EMBRAPA 2010. Tecnologias de Produção de Soja. Disponível em:<<http://www.cnpso.embrapa.br/html/sistemasdeproducao/controlado.htm>>. Data de acesso 05/12/2010.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artimed, 323p, 2004.

GOLDFARB, M; PIMENTEL, (L.) W; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, fev. 2009

GONÇALVES, P. A. S.; SANTOS, J. P.; NESI, C. N. Efeito de terra de diatomáceas e óleo essencial de citronela, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, sobre a incidência de mosca-dasfrutas, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), em cultivares de ameixeira em sistema orgânico. **Rev. Bras. de Agroecologia**. 2(3): 2007. Disponível

em < <http://www6.ufrgs.br/seeragroecologia/ojs/viewarticle.php?id=905&locale=es>>
acesso em 08/12/2010.

GUSMAN, A. B.; MUCILLO, G.; PIRES, M. H. Efeito do citrionelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). **Semina**, Londrina-PR, v11, n1 p. 20-24, 1990.

GUSMAN, A. B.; PITELLI, R. A.; DIAS, S. M. Efeito do citrionelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) II. **Semina Ci. Agr.** Londrina-PR. v.15, n. 1, p. 14-22, 1994.

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

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas: Plantas dicotiledôneas por ordem alfabética de famílias: Acanthaceae a Fabaceae. São Paulo: **Basf**, 2 edição, Tomo II, 1999.

KNBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of essential oil Research**, v.1, n.3, p.119-128, 1989.

KOFFI, K.; KOMLA, S.; CATHERINE, G.; CHRISTIINE, R.; JEAN-PIERRE, C.; LAURENCE, N. In vitro cytotoxic of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh j. pharmacol**, v.4, p. 29-34, 2009.

LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.

LORBER, P.; MULLER, W.H. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany**, v.63, p.196-200, 1976.

LORENZI, H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas: plantio direto e convencional**. 6 edição, Nova Odessa, SP, Brasil, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2006 339p.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193, 265-275. 1951.

MARCO, C. A.; BORGES, N. S. S.; CORREA, M. L. P.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; NASCIMENTO, I. B. Óleos essenciais de capim citronela e de alecrim pimenta na germinação de sementes de *Chloris barbata*, Sw. In **Anais CBO**, 2004, disponível em < <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=3456>>. Acesso em: 07/12/2010.

MARQUES, R. M.; MARQUES-SILVA, G. G.; BONATO, C. M. Effects of high dilutions of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronella) on the germination and growth of seedlings of *Sida rhombifolia*. **International Journal of High Dilution Research**,

v.7, n. 22, p. 31-35, 2008. Disponível em <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/208/342>>. Acesso em: 07/12/2010.

MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa phytopathol.** Botucatu, v. 34, n. 4, p. 3320337, 2008.

OLIVO, C. J.; CARVALHO, N. M.; SILVA, J. H. S.; VOGEL, F. F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C.; MOREL, A. F.; VIAU, L. V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.406-410, mar-abr, 2008.

OOTANI, M. A. Atividade inseticida, antifúngica e herbicida dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus*. 2010. 121 f. **Dissertação** (mestrado em produção vegetal)- Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2010.

PEREIRA, F. O. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor Sobre Dermatófitos do Gênero Trichophyton. 30/10/2009, 117 p. **Dissertação**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa –PB. 2009.

PFEFFER, P. E.; TU, S. I.; GERASIMOWICZ, W. V.; CAVANAUGH, J. R. In vivo ³¹P NMR of corn root tissue and its uptake of toxic metals. **Plant Physiol.**, v. 80, p. 77-84, 1986.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, p. 360-365, 2008.

REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. 1 ed. Netherlands. Springer, 2006. 637 p.

SHASANY, A. K.; LAL, R. K.; PATRA, N. K.; DAROKAR, M. P.; GARG, A.; KUMAR, S.; KHANUJA, S. P. S. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution** V. **47**, P. 553–559, 2000.

SILVA, J. C. Uso de óleos Essenciais, Extratos Vegetais e Indutores de Resistência no Controle Alternativo do mal-do-Panamá da Bananeira. 28/06/2007. 66 p. **Dissertação**. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo-AL, 2007.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; SETIA, N.; KOHLI, R. K. Herbicidal activity of volatile essential oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of Applied Biology**, v.146, p.89–94, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. ALELOQUÍMICO PRODUZIDO PELA GRAMÍNEA FORRAGEIRA *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 4 edição, Porto Alegre, Artimed, 819p, 2009.

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

VIEIRA, A. V.; INNECCO, R.; NASCIMENTO, I. B.; ANDRADE, N. D. M.; SOMBRA, J. N. S.; MARCO, C. A. Óleos essenciais na germinação de quiabo. In **Anais CBO**, 2004, disponível em <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_142.pdf>. Acesso em: 07/12/2010.

VOL, E.; GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. A. M.; ADEGAS, F. S. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. **Planta Daninha** VOL.20 no.1 Viçosa Apr. 2002.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA Jr., R. S. KREMER, R. J. CONSTANTIN, J. BONATO, C. M. MUNIZ, A. S. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 182-193, 2010.