

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

KARLA GABRIELA DA SILVA

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento e metabolismo
antioxidante de soja (*Glycine max*).

Maringá
2017

KARLA GABRIELA DA SILVA

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento e metabolismo antioxidante de soja (*Glycine max*).

Dissertação 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 Mestre em Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

Maringá
2017

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

S586e Silva, Karla Gabriela da
Efeitos do ácido p-metoxicinâmico sobre o
crescimento e metabolismo antioxidante de soja
(*Glycine max*) / Karla Gabriela da Silva -- Maringá,
2017.
52 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2017.

1. Aleoquímico 2. Enzimas antioxidantes. 3.
Metabolismo vegetal. 4. Soja. I. Ferrarese-Filho,
Osvaldo, orient. II. Marchiosi, Rogério, coorient.
III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de
Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 633.345

AHS

FOLHA DE APROVAÇÃO

KARLA GABRIELA DA SILVA

Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento e metabolismo
antioxidante de soja (*Glycine max*).

Dissertação 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 Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Patrícia da Costa Zonetti
UFPR – Campus Palotina

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

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
(Orientador)
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2017.

Local de defesa: Anfiteatro II, Bloco J45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo o apoio, paciência, por cada oportunidade, tempo e todo o empenho e esforços a mim dedicados.

Aos meus irmãos, mesmo estando distante sempre preocupados com meu bem estar.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder o dom da Vida. Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, incentivando e apoiando em todas as etapas, além dos meus irmãos.

Ao professor Osvaldo Ferrarese-Filho juntamente com o professor Rogério Marchiosi por abrirem as portas do Laboratório, por toda paciência, apoio e orientação.

A equipe BIOPLAN, por me receberem muito bem, por todo auxílio e apoio, sendo minha família de Maringá, em especial a Dr^a Rita de Cássia Siqueira Soares, Aparecida Maria e Tamires Letícia pela ajuda, paciência e compartilharem de todos os seus conhecimentos.

Aos meus amigos, Evandro Friedrichsen, Bárbara Fernanda Manzatti, Amanda Vasconcelos, Isabela Oliveira, por todo o apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Meu sincero agradecimento a todos que participaram dessa etapa, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, muito obrigada.

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Gandhi

SILVA, K.G., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2017, **Efeitos do Ácido *p*-metoxicinâmico sobre o crescimento e metabolismo antioxidante de soja (*Glycine max*)**. Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho; Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

RESUMO

Na vivência em comunidade, as plantas competem por água, nutrientes, luz, entre outros. Isso interfere na sobrevivência das espécies em um ecossistema. A percepção por plantas vizinhas se dá pela liberação de compostos no solo. Eles são denominados aleloquímicos e são formados a partir do metabolismo secundário das plantas. Estes aleloquímicos podem inibir ou ativar processos fisiológicos nas plantas. Neste contexto, os efeitos de diferentes concentrações do aleloquímico ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) foram avaliados sobre o crescimento e o metabolismo antioxidante das raízes de plantas de soja. Em geral, os dados obtidos mostraram que o estresse causado pelo aleloquímico resultaram em: 1) reduções dos comprimentos das raízes e dos caules de soja, com subsequente decréscimo nas biomassas frescas, mas pouca influência sobre as biomassas secas; 2) reduções na área foliar e biomassas frescas e secas das folhas; as quais foram mais afetadas que as raízes e os caules; 3) relevante necrose foliar após aplicação conjunta de AMC com Aureo[®] ou acetona; 4) aumentos nas atividades de enzimas antioxidantes (POD e CAT) e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), e redução na peroxidação lipídica. Em conjunto, esses resultados indicam que o AMC afetou raízes, caules e folhas de soja, seguido por uma resposta antioxidante envolvendo enzimas relacionadas para combater o estresse oxidativo.

Palavras-chave: aleloquímico, enzimas antioxidantes, metabolismo vegetal, soja.

SILVA, K.G., Maringá State University, February 2017, Effects of *p*-methoxycinnamic acid on growth and antioxidant metabolism of soybean (*Glycine max*). Adviser: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho; Co-adviser: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

ABSTRACT

In community life, plants compete for water, nutrients, light, among others. This interferes with species survival in an ecosystem. The perception by neighboring plants is given by the release of compounds in the soil. They are called allelochemicals, and are formed from plant secondary metabolism. These compounds can inhibit or activate physiological processes in plants. In this context, the effects of different concentrations of allelochemical *p*-methoxycinnamic acid (AMC) on the growth and antioxidant metabolism of soybean roots were evaluated. In general, the data showed that the stress caused by the allelochemical resulted in: 1) reductions of the lengths of the roots and stems, with subsequent decrease in fresh biomass, but few influence on dry biomass; 2) reductions in leaf area and fresh and dry biomasses; leaves were more affected than roots and stems; 3) relevant foliar necrosis after joint application of AMC with Aureo[®] or acetone; 4) increased activities of antioxidant enzymes (POD and CAT) and production of reactive oxygen species (EROS), and reduction of lipid peroxidation. Taken together, these results indicate that AMC affected roots, stems and leaves of soybean, followed by an antioxidant response involving related enzymes to combat the oxidative stress.

Keywords: allelochemical, antioxidant enzymes, plant metabolism, soybean.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Principais aleloquímicos (adapatado de Rice, 1984).....	6
--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aleloquímicos e prováveis rotas metabólicas.....	7
Figura 2. Estádios fenológicos da soja.....	11
Figura 3. Estruturas químicas do ácido cinâmico (A) e do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (B).....	13
Figura 4. Sementes dispostas em papel germitest® umedecido.....	16
Figura 5. Sistema de hidroponia e aeração de plântulas de soja.....	16
Figura 6. Sistema de hidroponia e aeração de plantas de soja.....	17
Figura 7. Espectrofotômetro de medição de área foliar.....	17
Figura 8. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre o comprimento das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	22
Figura 9. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	22
Figura 10. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	23
Figura 11. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre o comprimento dos caules de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	23
Figura 12. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca de caules de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	24
Figura 13. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca de caules de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	24

Figura 14. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a área foliar de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	25
Figura 15. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca de folhas de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	25
Figura 16. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca de folhas de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	26
Figura 17. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a viabilidade das células radiculares de plantas de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	26
Figura 18. Aplicação foliar de AMC, adjuvantes acetona.....	27
Figura 19. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da peroxidase solúvel (POD) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	28
Figura 20. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da catalase (CAT) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	28
Figura 21. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	29
Figura 22. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre o conteúdo de malondialdeído (MDA) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	29
Figura 23. Efeitos do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC) sobre o conteúdo de H ₂ O ₂ de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento.....	30
Figura 24. Microscopia confocal de EROS em raízes de soja. Ápices radiculares e secções transversais controles (A,B) e submetidas ao AMC 250 mg L ⁻¹	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos gerais.....	4
2.2 Aplicação da alelopatia.....	8
2.3. Cultura da soja.....	10
2.4 Milheto.....	11
2.5 Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico (AMC).....	112
2.6 Espécies reativas de oxigênio (EROS).....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	166
3.1 Material vegetal e procedimentos gerais.....	166
3.2 Análises de crescimento	177
3.3 Viabilidade celular	188
3.4 Aplicação foliar.....	188
3.5. Análises do estresse oxidativo	18
3.5.1 Extração enzimática	188
3.5.2 Determinação de proteínas	199
3.5.3 Atividade da catalase (CAT).....	199
3.5.4 Atividade da peroxidase solúvel (POD).....	199
3.5.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	20
3.5.6 Determinação da peroxidação lipídica	20
3.5.7 Determinação da produção de H ₂ O ₂ por iodeto de potássio.....	20
3.5.8 Determinação de EROS por marcador molecular.....	21
3.6 Análise estatística e software.....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	344
7. REFERÊNCIAS.....	355

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), na safra 2016/17, os três maiores produtores de soja, Estados Unidos, Brasil e Argentina lideram 83% da produção mundial. De acordo com a Embrapa Soja, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, alcançando uma produção de 95,631 milhões de toneladas (Conab, 2016).

Sabe-se que a cultura da soja é altamente susceptível ao ataque de pragas, e plantas daninhas e, a cada ano que passa, torna-se desafiador obter cultivares resistentes aos diversos e possíveis danos. O aumento no uso de agroquímicos e o prejuízo ao meio ambiente e à população tem gerado uma situação bastante preocupante e, diante disso, a busca por compostos que possuam potencial herbicida sem causarem danos ao meio ambiente e aos humanos está em evidência.

São conhecidos cerca de 10 mil metabólitos secundários com ação alelopática (Almeida, 1988). Alguns esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e também lactonas insaturadas vem revelando –se como herbicidas naturais, os quais estariam livres dos efeitos prejudiciais que são causados pelos herbicidas sintéticos.

Estudos realizados pela Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) trazem que plantas como a *Imperata cylindrica* (grama-de-sangue) possuem compostos que podem vir a inibir o crescimento de outras plantas. Estes são extraídos por solventes e são testados em diversas concentrações, a fim de verificar sua eficácia. Essas pesquisas buscam combater a evolução da resistência de pragas e das doenças aos pesticidas (Embrapa, 2014). Sendo que de início, idealiza-se isolar os compostos das plantas que apresentem potencialidade herbicida, assim, a criação de novos herbicidas naturais, que sejam menos persistentes nos ambientes e menos tóxicos que os produtos comerciais disponíveis.

No meio em que habitam, as plantas competem por água, luz, nutrientes, espaço físico, entre outros (Sampietro, 2001). Para conseguir sobreviver nestas condições, elas foram se adaptando e desenvolveram mecanismos de defesa, em especial pela liberação de compostos químicos que podem agir de forma benéfica ou não (Rice, 1984). A este processo natural denominou-se alelopatia, a qual é definida como interferência provocada por compostos químicos (ou aleloquímicos) produzidas por certos organismos (Szczepanski, 1977; Putnam e Duke, 1978; Rice, 1984). Os aleloquímicos são liberados

no meio ambiente na forma de volatilização, exsudação radicular, lixiviação de partes das plantas vivas e mortas e decomposição de resíduos, e se constituem de produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário das plantas (Souza et al., 2003).

Existem algumas classificações de compostos secundários. A mais geral, a qual praticamente não agrupa os compostos secundários, é a de Rice (1984). Outra classificação, mais simplificada, agrupa os compostos secundários em compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (Taiz e Zeiger, 2004). Em geral, as plantas são capazes de sintetizar estes compostos em todos os seus órgãos, sendo que a concentração dependerá de diversos fatores como tipo de solo, temperatura, luminosidade, estágio de desenvolvimento e pluviosidade; o efeito causado depende de cada espécie e da idade da planta (Pereira et al., 2008). Os aleloquímicos mais comuns pertencem, em sua maioria, ao grupo de compostos fenólicos, incluindo as cumarinas, flavonoides, estilbenos e ácidos fenólicos, pertencentes às espécies aquáticas e terrestres (Buchanan et al., 2000; Macedo et al., 2007).

Experimentos anteriores realizados no Laboratório de Bioquímica de Plantas, da UEM, indicaram que o extrato aquoso de palhada de milho, uma forrageira anual muito usada em consórcio de culturas, contém o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC). Identificado por meio de ressonância magnética nuclear (RMN), AMC é um ácido fenólico encontrado, também, nos farelos de arroz e no açafrao, entre outros. Embora AMC tenha conhecidos efeitos em humanos, como antiproliferativo em algumas células cancerosas, quimiopreventivo, atividade antipirética e analgésica, não há relatos de seus efeitos como aleloquímico.

O agronegócio brasileiro é responsável por 24% do Produto Interno Bruto (PIB), de acordo com os dados da Confederação Nacional da Agricultura (CNA), em 2008, sendo que a soja foi uma das principais responsáveis pela introdução deste conceito (agronegócio) no país, não só pelo volume físico, mas pelo financeiro.

A geração de tecnologias seria um dos fatos que pudessem explicar o motivo do aumento da produtividade da soja pelo Brasil, o qual, ocupa a segunda posição em produção no mundo.

Em nível mundial, a soja representa a maior oleaginosa que é produzida e subsequentemente consumida. Tal importância, se deve ao fato de que é utilizada no consumo animal (farelo de soja), no consumo humano (óleo e também grão *in natura*).

A tecnologia está presente em cerca de 93% da área de soja do país. As sementes transgênicas - aquelas modificadas geneticamente- e, colaboram com um aumento na

produtividade para os produtores. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), na safra 2014/2015, a produção cresceu 11,7%.

Atualmente, a produção de transgênicos se faz presente em quase todas as regiões agrícolas, além da introdução da biotecnologia pelos produtores atingir níveis jamais observados em vista de outras técnicas. Em 2009, por exemplo, culturas geneticamente modificadas foram adotadas por mais de 14 milhões de agricultores (Isaaa, 2010). Este sucesso, se deve ao fato dos benefícios da produção de plantas transgênicas resistentes a doenças e insetos, reduzindo a quantidade de defensivos a ser utilizada, com subsequente aumento da produção.

De acordo com James (2010), do total cultivado, variedades transgênicas como as que apresentam resistência aos insetos (*Bt*) e tolerantes a herbicidas (glifosato), expunham mais de 99% da área cultivada.

Diante da importância dos grãos de soja para a agricultura, da tentativa de minimizar o uso de defensivos agrícolas, e da busca por novas moléculas com potencial herbicida objetivou-se, neste trabalho, avaliar os efeitos do AMC sobre plantas de soja. Especificamente, avaliou-se o efeito do composto desde a germinação das sementes, crescimento, área foliar, viabilidade, focando o metabolismo antioxidante, o qual é sabido ser influenciado por condições de estresses bióticos e abióticos associados ao aumento de EROS, como primeira resposta manifestada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

De acordo com Alvez et al. (2004), alelopatia pode ser definida como um processo em que uma planta libera compostos metabólicos secundários impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas vizinhas. Essas substâncias pertencem a diferentes categorias e podem ser identificadas por meio de procedimentos de extração, isolamento, purificação, entre outros processos (Ferreira e Aquila, 2000).

Esse fenômeno também pode ser definido como um mecanismo que estuda qualquer processo, desde que envolva metabólitos secundários produzidos em algas, plantas, fungos e bactérias. Dessa forma, Ferreira e Áquila (2000) e outros colaboradores (Dias, 2005) afirmam que a alelopatia não é uma competição pois, não estão a procura de elementos limitados – luz, água e também nutrientes.

Já, para Ferreira (2004), este termo pode interferir de maneira positiva ou negativa dos compostos secundários que são lançados no meio e, estes, podem ser liberados via aérea, como alguns terpenos, lixiviado de plantas, restos ou até por serrapilheira.

Como as plantas são imóveis (Larcher, 2000), desenvolveram uma maneira de se protegerem contra predadores, competidores e quaisquer tipo de interferência que possa vir a interromper seu ciclo de vida. Desta forma, a presença de espinhos, acúleos, estruturas lenhosas, produção de compostos secundários, toxinas, dentre outros, foram as formas pelas quais as plantas investiram como defesa. Os compostos alelopáticos estão relacionados a prevenção de decomposição das sementes, dormência de gemas, relação com demais plantas, animais e, também, com o homem (Castro et al., 2002).

Dentre os fatores que possam influir na capacidade de ação dos metabólitos nos vegetais, podemos citar, umidade, temperatura, índice de precipitação, radiação, solo e demais fatores que possa vir a alterar a rota biossintética (Taiz e Zeiger, 2004).

Os compostos químicos responsáveis pela alelopatia são denominados aleloquímicos (Soriano, 2001), os quais podem causar tanto efeitos benéficos como maléficos (Carvalho et al., 2002). Ainda existem dúvidas se eles representam o produto final do metabolismo celular ou se as plantas os sintetizam para funções específicas. Para Miller (1996), os metabólitos secundários de plantas e seus produtos de degradação são importantes em todos os agroecossistemas, inclusive em plantas forrageiras. Em geral, os

compostos secundários são diferentes dos primários, isto é, apresentam especificidade, são restritos a algumas espécies vegetais, sendo que todas as plantas os produzem, porém ocorrem variações na qualidade e quantidade (Taiz e Zeiger, 2009).

Levando em conta que a cada dia aumenta o uso indiscriminado de agroquímicos sem maiores preocupações com o meio ambiente, com as culturas próximas, os rios, e até mesmo com a própria população, a expectativa é a de se encontrar moléculas potencialmente herbicidas, porém com baixos efeitos residuais ou, até mesmo, sem qualquer efeito de contaminação. Diante disso, a importância dos estudos com alelopatia vem se destacando. Esta expectativa tem como base o fato de os aleloquímicos liberados pelas plantas afetarem o crescimento, o desenvolvimento e, até mesmo, inibirem a germinação de sementes (Silva, 1978). Além disso, Whittaker e Feeny (1971) sugeriram dois aspectos que devem ser considerados para a indicação de um composto com característica alelopática: 1) que um inibidor químico efetivo esteja sendo produzido e ocorra numa concentração potencialmente efetiva no solo, e 2) a inibição não pode ser caracterizada por efeito de competição da planta por luz, água e nutrientes.

Como são produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário (Rodrigues e Lopes, 2001) de certa forma as plantas reconhecem os organismos que possam vir a lhe prejudicar ou não (Almeida, 1993). Para tanto, existem diversos estudos que evidenciam o uso da alelopatia como uma possível estratégia. Como citado, o efeito dos metabólitos varia em quantidade e qualidade e, dessa forma, existem espécies mais ou menos sensíveis, como exemplo, *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate), as quais são muito utilizadas como modelos (Ferreira e Áquila, 2000).

Dessa forma, a inibição alelopática não é um fator isolado, isto é, há uma associação de fatores que, coletivamente interferem em vários processos fisiológicos e dependem ainda da intensidade dos estresses abióticos e bióticos. Ainda, não podemos esquecer-nos de fatores como temperaturas extremas, deficiência de nutrientes, umidade, radiação, insetos, doenças, pragas e herbicidas (Einhelling, 1996). Contudo, é sabido que os efeitos dos aleloquímicos estão relacionados aos processos fisiológicos das plantas, afetando então, germinação das sementes, crescimento de plântulas, influenciam na assimilação de nutrientes, na fotossíntese, respiração, na síntese de proteínas, atividades de inúmeras enzimas e na perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (Durigan e Almeida, 1993; Rodrigues et al, 1993; Einhelling, 1996).

Vários tipos de compostos orgânicos foram identificados como aleloquímicos, sejam eles produzidos por microrganismos ou plantas superiores (Rice, 1984), e assim este autor classificou-os de uma forma geral, como mostra a Tabela 1.

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. A figura 1, a seguir, mostra as principais vias metabólicas que levam à síntese de vários aleloquímicos.

Tabela 1. Principais aleloquímicos (adaptado de Rice, 1984).

Ácidos orgânicos	Solúveis em água, álcoois de cadeia reta, aldeídos alifáticos e cetonas; ácidos cítrico, málico, acético e butírico; metanol, etanol e acetaldeído
Lactonas insaturadas simples	Patulina e ácido parasórbico
Ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos	Oleico, esteárico, mirístico e agropireno
Naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas	Juglona, tetraciclina e aureomicina
Fenóis simples ácido benzoico e derivados	Ácido gálico, ácido vanílico e hidroquinona
Ácido cinâmico e derivados	Ácido clorogênico e ferúlico
Cumarinas	Escopetina e umbeliforona
Flavonoides	Quercitina, florizina e catequina
Taninos condensados e hidrolisáveis	Ácidos elágico e digálico
Terpenoides e esteroides	Cineole, canfora e limoneno

Aminoácidos e polipeptídeos	Marasmina e victorina
Alcaloides e cianoidrinas	Estrequinina, atropina, codeína, cocaína e amidalina
Sulfetos e glicosídeos	Sirigrina e alisotiocianato
Purinas e nucleosídeos	Cordicepina, teofilina e paraxantina.

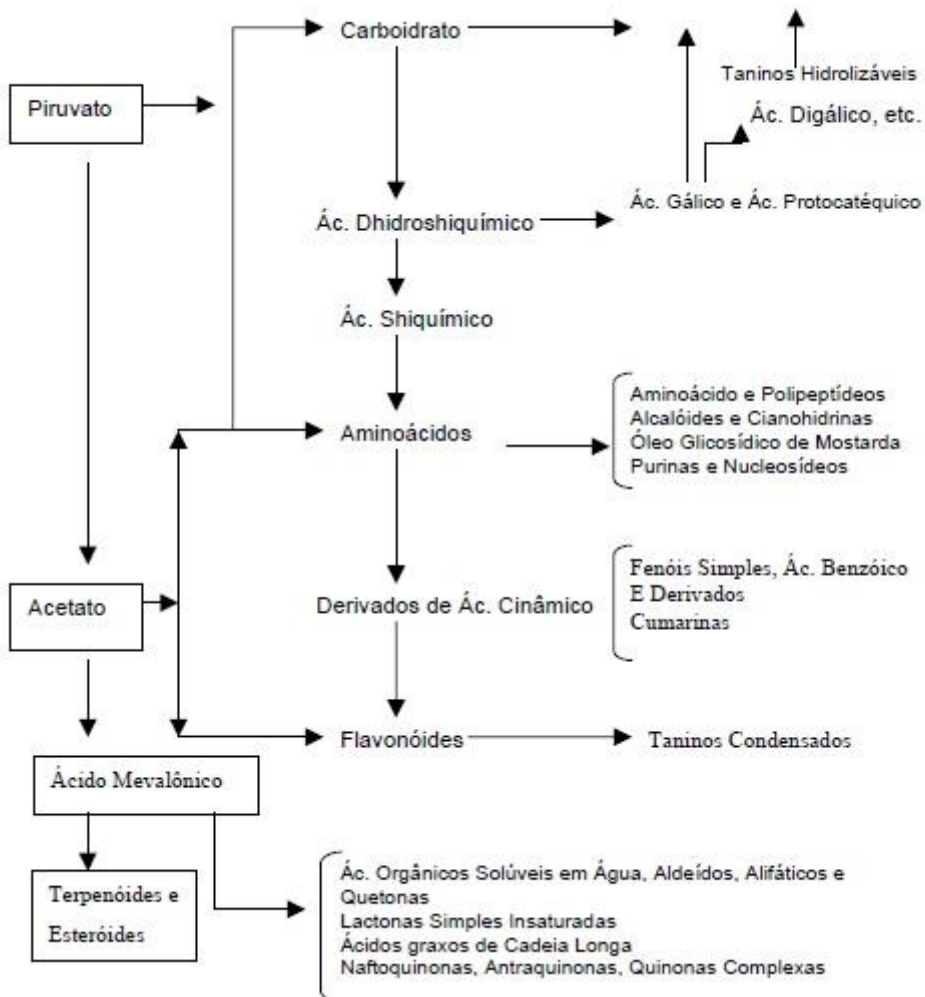


Figura 1. Aleloquímicos e prováveis rotas metabólicas. Fonte: Boletim agropecuário Universidade Federal de Lavras – alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens.

São conhecidos pelo menos dez mil compostos secundários com ação alelopática e, após diversas tentativas de agrupamento, Taiz e Zeiger (2004) adotaram uma divisão destes compostos 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.

2.2 Aplicação da alelopatia

Sabe-se que a germinação é um dos estádios mais afetados pelos aleloquímicos (Ferreira e Áquila, 2000), podendo tornar uma cultura desuniforme. Podem provocar estresse oxidativo, atuando como processo sinalizador nos processos de degradação celular, alterando processos fisiológicos e o desenvolvimento (Almeida et al., 2008).

Uma estratégia bastante utilizada pelos produtores rurais é a de rotação de culturas, uma técnica que tem por objetivo diminuir o esgotamento do solo. De maneira simples, as culturas são trocadas a cada novo plantio para que se mude a necessidade das adubações. Esta técnica é praticada principalmente por pequenos produtores, e tem sido bem vista com o uso de hortaliças que apresentam um forte poder alelopático.

Além de hortaliças, outra espécie muito almejada nos estudos da alelopatia são as plantas daninhas, as quais são frequentemente eliminadas por métodos químicos. Isso se deve ao fato de que os métodos mecânicos, como por exemplo a catação, se tornam alternativas negativas, pois, pode ocorrer espalhamento de sementes seguido de altas taxas de germinação. Por exemplo, picão (*Bidens pilosa*) é uma invasora bastante agressiva, pois compete com a cultura e ainda pode ser hospedeiro de pragas e doenças, levando a perdas na produtividade (Kissmann, 1997).

Outra importante planta daninha, localizada na região amazônica, é a assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). Estudada por Souza Filho e colaboradores (1996), o potencial alelopático de seus extratos aquosos foi avaliado sobre a germinação e desenvolvimento das radículas de três espécies de *Brachiaria*. Estes autores observaram que a parte aérea desta planta é a principal fonte de compostos químicos com atividades alelopáticas.

É importante ressaltar que plantas daninhas possuem dois tipos de interferência, as quais são denominadas alelospolia e alelopatia. O primeiro trata-se de uma interferência por competição a fatores tidos como essenciais, como a água, luz, nutrientes; em contrapartida a alelopatia se refere à produção e liberação de compostos químicos.

A semeadura direta é uma técnica de cultivo muito comum no Brasil, onde a decomposição de resíduos da própria cultura libera compostos orgânicos. Esses resíduos orgânicos, alguns com potencial alelopático, podem influenciar o desenvolvimento de plantas daninhas (Almeida, 1989). Por exemplo, resíduos de palha de trigo foram utilizados como umidificantes na germinação de *Ipomoea hederacea*, *Sesbania exaltata*, *Senna obtusifolia*, sendo que em todas observaram-se inibições da germinação (Almeida, 1991). Estudos semelhantes foram realizados com colza (*Brassica napus*) sobre picão-preto (*Bidens pilosa*), capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e guanxuma (*Sida* sp.). Os resultados revelaram atividade alelopática da colza, com crescimentos reduzidos das plantas testadas, principalmente nos anos mais secos.

A maioria das pesquisas de alelopatia envolvem plantas daninhas, espécies nativas, exóticas e, em vários casos, plantas medicinais. Por exemplo, Lorenzi (2002) verificou a presença de cumarina e outros compostos em guaco (*Mikania glomerata* Spreng), sendo que a presença de compostos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonoides, taninos entre outros, são encontrados em metabólitos secundários. Em marcela (*Achyrocline satureioides* Lam. D.C.) foram encontrados monoterpenos e flavonoides (Martins et al., 2000). Em contrapartida, a atividade alelopática de artemisinina foi verificada na inibição da germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas como *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Amaranthus blitum*, *L. sativa*, *Raphanus sativus* (Bagchi et al., 1997).

Alelopatia também se caracteriza por variantes como autotoxicidade ou alelopatia intraespecífica, onde a planta produz compostos químicos que prejudicam a germinação e/ou desenvolvimento da própria espécie (Chon, 2004). Outra variante é a interespecífica, isto é, quando os indivíduos são de espécies diferentes (Ferreira e Borghetti, 2004). Neste caso, o principal destaque é o extrato volátil de óleo de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), que promoveu o crescimento de radículas, ou seja, um efeito benéfico (Alves et al., 2004).

É importante destacar que apenas o uso de plantas potencialmente alelopáticas não é suficiente, sendo interessante aliar outras técnicas de manejo (Trezzi et al., 2016) como

o físico, mecânico, biológico, culturas e o químico. Isto para que o número de plantas que venham a interferir na produtividade da cultura não seja maior que ela mesma.

2.3 Cultura da soja

Soja (*Glycine max* L. Merrill) é a principal oleaginosa cultivada no mundo. Seu elevado teor de proteínas (40%) faz dela a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais domésticos e, apesar de seu baixo teor de óleo (19%), disputa com o dendê a posição de maior produtora de óleo. Dentre os maiores produtores mundiais (EUA, Brasil e Argentina), o Brasil é o que possui potencial de expansão da área cultivada e, dependendo das necessidades de consumo, pode mais do que duplicar sua atual produção. Ela foi introduzida no Brasil em 1882 no estado da Bahia, sendo seu germoplasma trazido dos EUA (Roessing et al., 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, estando atrás apenas dos EUA. De acordo com dados da EMBRAPA, na safra de 2015/2016 esta cultura ocupou uma área de 33,17 milhões de hectares, com produção de 95,63 milhões de toneladas, sendo que a produtividade média ficou em torno de 2,882 kg por hectare (CONAB, safra 2015/2016).

A soja pertence às dicotiledôneas, da família Fabaceae (AGEITEC, 2016). Tem melhor adaptação em temperaturas entre 20 e 30 °C. Pode ser cultivada em qualquer tipo de solo, de média fertilidade e que não sejam muito ácidos. A cultura pode sofrer doenças fúngicas, bacterianas e viróticas. Sua colheita deve ser iniciada quando a mesma atingir o estágio R8 (Figura 2). A água, nesta planta, constitui aproximadamente 90% do seu peso, presente em todos os processos bioquímicos e fisiológicos. Tem por função, atuar como solvente, onde irão mover-se pela planta, gases e minerais, entre outros. A disponibilidade de água para a soja é crucial em dois períodos, o de germinação-emergência e a para a floração-enchimento de grãos.

A colheita é uma etapa importante na produção da soja, devendo ser feita quando atingir o estágio R8. Seguindo essa recomendação a eficiência da colheita tem relação com o preparo do solo, a época correta para semeadura, se a cultivar é a própria para determinado local, presença de plantas daninhas, passar do tempo de colheita, umidade fora do padrão, entre outros fatores que possam vir a influenciar o período de permanência da cultura e também afetar diretamente na produtividade.

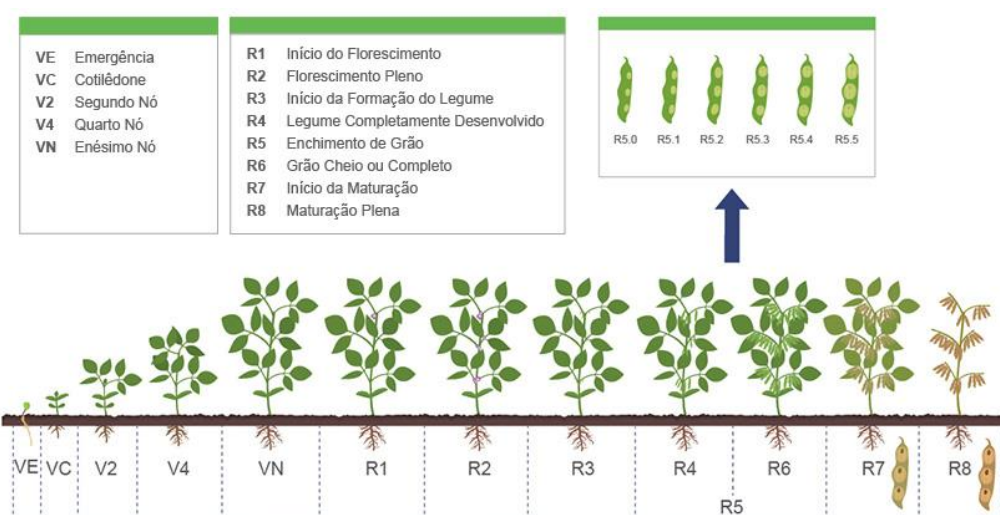


Figura 2. Estádios fenológicos da soja (Fonte: deprimeirasemduvida.com.br).

2.4 Milheto

A planta milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown) surgiu ao sul do deserto do Saara, sendo levada para Índia após o ano 2.000 a.C. É uma cultura muito cultivada na África Saheliana e Sudanesa.

Milheto é uma espécie anual de clima tropical, pertencente à família Poaceae, e que se adapta às diversas condições de clima e solo. Destaca-se pelo elevado potencial como forrageira, tanto quanto silagem e pastagem, devido às suas capacidades de rebrota e nutricional (Kollet et al., 2006; Costa et al., 2011; Pinho et al., 2013). É originária da África e introduzida no Brasil na década de 1970 (Martins Neto, 1998), sendo amplamente utilizada na alimentação humana.

Pertence à família das gramíneas (Poaceae), bem adaptada ao cerrado brasileiro (Scaléa, 1998), devido a tolerar déficit hídrico prolongado e seu sistema radicular fasciculado e profundo (Silva et al., 1996), vem sendo uma ótima alternativa para formação de palhada para o plantio direto em regiões dos cerrados (Oliveira et al., 2002; Cazetta et al., 2005), levando a uma alta cobertura do solo e ciclagem de nutrientes.

Devido a sua importância na alimentação, pastagem, silagem, entre outros, Vidal e Trezzi (2004) avaliaram os efeitos alelopáticos e físicos e a supressão diferencial de plantas daninhas por genótipos de milheto, tendo cerca de 74% em redução na matéria seca total de invasoras.

Em 2002, Oliveira e colaboradores verificaram a produção de 14 t h⁻¹ de matéria seca quando houve cultivo de milheto, o que acarretou maior proteção do solo, maior

retenção de umidade e favoreceu a produção de grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Já, em 2004, Trezzi e Vidal notaram a supressão de plantas daninhas, constataram reduções médias de 91, 96 e 59% na infestação de *Brachiaria plantaginea*, *Sida rhombifolia* e *Bidens pilosa*, supostamente, a palhada impõe uma supressão que age como barreira física e liberam aleloquímicos que atuam sobre plantas daninhas.

2.5 Ácido *p*-metoxicinâmico (AMC)

O uso de gramíneas anuais vem sendo muito utilizado em cultivo direto, principalmente como cobertura de solo. Uma das mais bem vistas na atualidade é o milho, o qual apresenta características favoráveis como alta tolerância a períodos de seca, adaptabilidade, raízes fasciculadas, entre outras vantagens.

Em recente trabalho do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Plantas, da UEM, foi constatado que o extrato aquoso de palhada de milho possui relevante atividade inibitória sobre o crescimento de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), o qual foi devido à presença do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) no referido extrato. Para isso, a gramínea foi particionada em diversos solventes, e as frações testadas sob a germinação e crescimento de outra planta. Marchiosi (2012) verificou que a fração hidrometanólica desenvolveu maior atividade alelopática em plantas de soja, milho e também em plantas daninhas. Dessa forma, nas análises com a planta daninha *Euphorbia heterophylla*, o crescimento das raízes foi reduzido, além da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase. Usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível verificar redução no alongamento da raiz e redução de viabilidade celular (Silva, 2013). Portanto, por meio da caracterização desta fração hidrometanólica foi constatada a presença de AMC, levando a acreditar que este composto apresente potencial alelopático.

O ácido *p*-metoxicinâmico é um derivado do ácido cinâmico (Figura 3). O ácido cinâmico é denominado 3-fenil-2-propenóico, sua estrutura é encontrada na forma *trans* (Liu et al., 1995). Possui efeitos terapêuticos antimicrobiano e antifúngico (Ekmekcioglu et al., 1998). Ele possui diversos derivados fenólicos, como exemplos, ferúlico, cafeico, além do *p*-metoxicinâmico. Este último, encontra-se em grãos de *Oriza sativa* (arroz), em *Curuma longa* (açafraão-da-terra) e também em *Kaempferia galanga* (planta ornamental) (Brown, 1965; Strack, 1997; Hudson et al., 2000). São poucos os trabalhos com o AMC,

porém há relatos de ser um propício nematicida contra o *Meloidogyne incognita*, chegando a 97% de mortalidade (Mahajan et al., 1992).

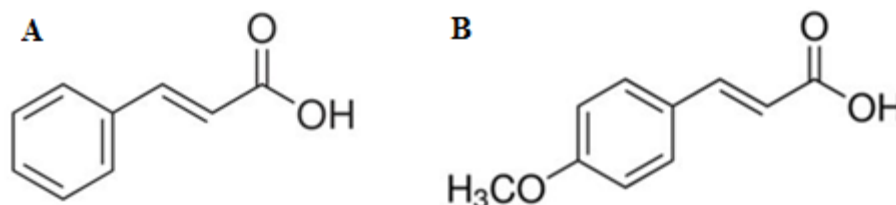


Figura 3. Estruturas químicas do ácido cinâmico (A) e do ácido *p*-metoxicinâmico (B).

2.6 Espécies reativas de oxigênio (EROS)

Estresse é em geral definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta (Taiz e Zeiger, 2004). Existem diferentes tipos de estresses como salino, hídrico, luminoso e por ataque de patógenos, entre outros fatores ambientais.

É oportuno que um determinado organismo seja capaz de produzir diversos aleloquímicos, e que, entre estes, se desencadeiam diversas interações quando entram em contato com uma planta-alvo. Os sintomas que podem ser observados, são apurados pelo conjunto de efeitos produzidos pelos aleloquímicos absorvidos, dessa forma, é complexo, mesmo ocorrendo a identificação destes, estabelecer qual deles provoca/provocou o efeito observado (Almeida, 1988; Durigan e Almeida, 1993).

Apesar do oxigênio (O₂) ser essencial para a vida, a sua redução pode resultar em espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem facilmente perturbar uma variedade de processos metabólicos dentro de uma planta (Foyer et al., 1994; Asada, 1999). Quando o O₂ sofre redução, origina EROS como superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogenio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH•). Segundo Foyer e Noctor (2003), em nível celular o estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de EROS e a defesa antioxidante. Halliwell e Gutteridge (2007) trazem que a defesa antioxidante é quaisquer substâncias que atrasam, removam ou previnam os danos oxidativos, isto é, um fator de tolerância. Os antioxidantes então, que são os representantes da defesa no organismo contra as espécies reativas de oxigênio, podem ser dividido em enzimáticos e não-enzimáticos. Dessa forma, a eliminação dos radicais livres é um sistema natural, e a

eliminação dos mesmos ou então a sua não transformação em produtos mais tóxicos para a célula é realizada por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Seu efeito torna-se prejudicial quando em quantidade excessiva, e o organismo não os consegue neutralizar. Para o sistema enzimático pode-se citar enzimas como glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase, entre outras. Já, para o sistema não-enzimático, as vitaminas lipossolúveis (A, E e β -caroteno), vitaminas hidrossolúveis (C e B), bioflavonoides entre outros.

Dentre os locais de formação de EROS estão as organelas com elevada atividade metabólica oxidante ou com taxa elevada de transporte de elétrons, como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Dat et al., 2000; Mittler et al., 2004).

Em quantidades reduzidas, EROS tem função benéfica como a de sinalização para regular ciclo celular, crescimento e também o desenvolvimento. Porém, em quantidades que já classifiquem seu efeito oxidativo podem causar peroxidação dos lipídios da membrana, oxidação proteica e inibição enzimática, além de danos em nível de DNA e RNA. Estas alterações podem gerar senescência, mau funcionamento da fotossíntese e necrose foliar (Scandalios, 2002).

Para reduzir os efeitos de EROS e controlar a sua quantidade, os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático. Nos sistemas de defesa não enzimático estão incluídas as vitaminas C e E, glutathione (GSH), β -caroteno, compostos fenólicos, tocoferóis e poliaminas. Nos sistemas enzimáticos estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) peroxidases (POD), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GSTs) (Blokhina et al., 2003; Scandalios, 2005).

Essas EROS são geradas em diversos compartimentos celulares como decorrência do funcionamento impróprio de vias metabólicas e em processos fisiológicos (Allen, 1995; Apel e Hirt, 2004). Dentre as diversas fontes que proporcionam a formação de ROS sobressaem-se: a cadeia transportadora de elétrons, fotossistemas I e II, enzimas produtoras de H_2O_2 , reações fotossensíveis (Bartosz, 1997).

Em estudos realizados com o ácido cinâmico em pepino (Yu e Matsui, 1997) perceberam extravasamento de íons e permeabilidade de membranas, ainda, incremento da atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), e peroxidase (POD), dessa forma, levando a uma redução na fotossíntese (Yu et al, 2013).

Dados observados por Willadino (2011) na variedade RB 861515 de cana-de-açúcar, verificaram um mecanismo mais eficiente na proteção da planta contra a ação de EROs, particularmente, H_2O_2 devido ao aumento das atividades das enzimas CAT e APX. Esses dados corroboram com a premissa de o aumento na atividade dessas enzimas na desintoxicação do H_2O_2 e proteção contra danos oxidativos (Cia et al; 2012).

Entretanto, em relação ao estresse hídrico, Silva (2010) avaliou seis genótipos de cana e observou um aumento de 30,23% na atividade da APX. Já, Azevedo (2013) constatou aumentos nas atividades da CAT e APX em cana-de-açúcar, em altos níveis de salinidade. Estudando a aclimação de arroz sob estresse salino, Carvalho (2011) verificou redução na atividade da CAT.

O sistema antioxidante aumenta a tolerância da planta, pois diminui a ação de EROS. Na primeira linha de defesa atuam a superóxido dismutase (SOD), dismutando o superóxido ($O_2^{\circ-}$) a H_2O_2 . Já, catalase (CAT) rapidamente degrada H_2O_2 em H_2O e O_2 (Resende et al., 2003). As peroxidases tem funções importantes, auxiliando na defesa ao ataque de patógenos aumentando barreiras mecânicas. Além disso, possuem envolvimento na resposta ao estresse (Campa, 1991). Sua principal função é a de eliminação do H_2O_2 , também pode catalisar a formação de $O_2^{\circ-}$ e H_2O_2 .

Sabendo do possível potencial alelopático do AMC pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Plantas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cultura da soja exposta ao AMC, monitorando suas respostas ao estresse oxidativo e seus respectivos efeitos diante do metabolismo antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e procedimentos gerais

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivar BMX Potência RR, foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% durante 5 min. Em seguida, as sementes foram distribuídas em folhas de papel Germitest CEL-060 umedecidas com água deionizada (Figura 4). Os rolos confeccionados foram acondicionados em câmara escura a 25°C por 3 dias. Após esse período, plântulas uniformes foram selecionadas e transferidas para recipientes de vidro contendo 350 mL de solução nutritiva de Hoagland meia força, estes recipientes permaneceram em sala com temperatura e luminosidade controladas, além de permanecerem sob sistema de aeração (Figura 5).



Figura 4. Sementes dispostas em papel germitest® umedecido.



Figura 5. Sistema de hidroponia e aeração de plântulas de soja.

As plântulas receberam irradiação de $300 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12h (escuro/claro) e temperatura de 25°C . Para evitar a deficiência de nutrientes, devido a exposição a luz, aeração e consumo da própria planta, a solução nutritiva foi substituída a cada dois dias. As plantas permaneceram nessas condições por 14 dias (Figura 6), sendo que os tratamentos com AMC foram realizados no 10º dia de cultivo pela adição de solução nutritiva contendo AMC nas concentrações de 50, 100 e 250 mg L^{-1} . O experimento controle, realizado juntamente com os tratamentos, não continha AMC.

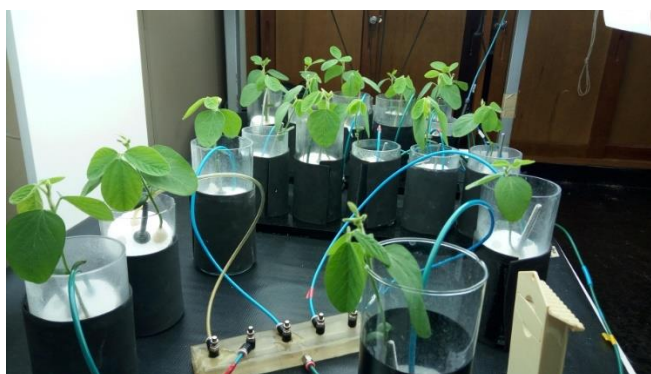


Figura 6. Sistema de hidroponia e aeração de plantas de soja.

3.2 Análises de crescimento

No 14º dia de cultivo, as plantas foram retiradas do sistema experimental, lavadas em água deionizada e, então, separadas em raízes, caules e folhas. Em seguida, foram determinados os comprimentos de raízes e caules, bem como as biomassas frescas de raízes, caules e folhas. A biomassa seca foi determinada após a desidratação dos tecidos em estufa à 60°C por 72 h. A área foliar foi determinada com auxílio de um integrador de área foliar (Figura 7), o qual realiza um escaneamento que se baseia no princípio de células de grade de área conhecida. As medições foram realizadas utilizando o modelo LI 3100 da marca LI-COR (LI-COR, 1996).



Figura 7. Espectrofotômetro de medição de área foliar.

3.3 Viabilidade celular

No 14º dia de cultivo, as raízes foram retiradas do sistema experimental e acondicionadas em placa de Petri contendo 15 mL de Azul de Evans 0,25%, por 15 min. Em seguida, as raízes foram lavadas abundantemente em água destilada, permanecendo imersas em água deionizada por 30 min. Então, as extremidades radiculares (aproximadamente 0,5 cm) foram excisadas e colocadas em tubo eppendorf contendo 1 mL de dimetilformamida para extração do corante por 50 min. A absorvância da solução de dimetilformamida foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm (Zanardo et al., 2009).

3.4 Aplicação foliar

Em outro ensaio realizado com plantas de soja, cultivadas em sistema hidropônico como descrito anteriormente, foram tratadas com AMC através de aspersão foliar no 10º dia de cultivo, a fim de avaliar os efeitos que o mesmo poderia causar sobre essas plantas. Visando maximizar a absorção, o AMC foi inicialmente dissolvido em adjuvantes comumente utilizados na agricultura em associação com agrotóxicos. Os adjuvantes utilizados foram Assist[®] (BASF) e Aureo[®] (Bayer), ambos preparados na dosagem especificada pelo fabricante. Plantas tratadas apenas com os adjuvantes foram usadas como controle. Em cada sistema experimental contendo uma planta foram aspergidos 3,75 mL de solução de AMC + adjuvante com auxílio de um borrifador, posicionado a aproximadamente 20 cm das folhas. No 20º dia de cultivo as plantas foram fotografadas e os tratamentos comparados com os controles, sendo realizada apenas análise visual dos efeitos causados.

3.5 Análises do estresse oxidativo

3.5.1 Extração enzimática

Raízes (1,0g) foram maceradas em nitrogênio líquido e então homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA 1 mM, ditiotreitól 3 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 10000 g por

30 min e o sobrenadante armazenado em freezer a -80°C até o momento das análises (Azevedo, 1998).

3.5.2 Determinação de proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). Alíquotas do extrato enzimático, preparado como descrito anteriormente, foram apropriadamente diluídas e combinadas com o reagente de Bradford. A reação procedeu por 5 min e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. Uma solução de albumina bovina a 50 mg% foi utilizada como padrão.

3.5.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme descrito por Mlickova (2004). Inicialmente, 50 μL do extrato enzimático foram adicionados a tubos de ensaio contendo 50 μl de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0). A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de H_2O_2 60 mM. A mistura reativa foi incubada em banho-maria a 37°C por 4 min, sendo a reação paralisada com 0,5 mL de molibdato de amônio 32,4 mM. Em seguida, as amostras foram retiradas do banho-maria e levadas ao escuro por 5 min. A quantidade de H_2O_2 consumido na reação foi monitorada em espectrofotômetro a 405 nm. A atividade da CAT foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de uma curva-padrão de H_2O_2 ($\epsilon = 0,0085 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.5.4 Atividade da peroxidase solúvel (POD)

A determinação da peroxidase solúvel (POD) foi realizada pelo método de Putter, através da formação do tetraguaiacol. O meio reacional foi preparado adicionando-se 2,15 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), 10 μL de guaiacol 0,3 mM e 35 μL de H_2O_2 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 400 μL de extrato enzimático e a produção de tetraguaiacol acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm por 5 min. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mols de tetraguaiacol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína.

3.5.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada como descrita por Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), nitro blue tetrazolium (NBT) 75 μ M, L-metionina 13 mM, riboflavina 4 μ M e 20 μ L do extrato enzimático. A mistura foi mantida a 25°C sob luz por 10 min. A redução do NBT foi acompanhada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade (U) de enzima $\text{mg}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição na taxa de redução de NBT.

3.5.6 Determinação da peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica, determinado pela medida do acúmulo de malondialdeído (MDA) (produto da peroxidação de ácidos graxos insaturados), baseou-se na metodologia proposta por Baziramakenga et al. (1995), com algumas adaptações. Para isso, raízes frescas (0,5 g) foram inicialmente homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 67 mM (pH 7,0). Em seguida, o material foi centrifugado a 3300 g por 5 min e o sobrenadante reservado em frascos âmbar. Então, 1 mL do extrato foi adicionado a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (preparado em ácido tricloroacético 20%) e a mistura acondicionada em banho-maria a 90°C durante 10 min. A mistura foi resfriada em banho de gelo por 15 min e centrifugada a 3500 g por 5 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 532 nm (complexo colorido MDA-TBA). Os valores de MDA foram expressos em μ moles g^{-1} de massa fresca da raiz.

3.5.7 Determinação da produção de H_2O_2 por iodeto de potássio

Raízes frescas (0,5 g) foram maceradas em gral gelado com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% por 1 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 3200 rpm por 20 min e o sobrenadante armazenado em frascos âmbar a 4°C. Brancos foram preparados com 500 μ L de TCA 0,1%, 500 μ L de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 250 μ L de iodeto de potássio. Para as amostras, tubos foram preparados contendo 250 μ L de iodeto de potássio, 500 μ L de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 500 μ L de

extrato. A reação procedeu-se por 1 min em cubeta no escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm.

3.5.8 Determinação de EROS por marcador molecular

Ápices radiculares de soja foram incubados em 1 mL de tampão PBS contendo 5 μ L de substrato fluorogênico 2,7-dicloro di-hidroacetato de fluoresceína (H₂DCFDA) por 30 min ao abrigo da luz. Após este período, os ápices das raízes foram colocados em lâmina de vidro e, então, observadas ao microscópio confocal (Microscópio Zeiss - Confocal a Laser - LSM). O corante utilizado tem absorção máxima em 492-495 nm e emissão máxima em 517-527 nm. Foi utilizado um laser de 488 nm a 7% de potência para excitação e a emissão registrada entre HFT 488, NFT 515, filtro BP 505-530. Secções transversais de raízes obtidas manualmente também foram analisadas.

3.6 Análise estatística e software

Os dados obtidos foram expressos como a média dos experimentos independentes \pm erro padrão da média. A análise de variância, para testar a significância das diferenças observadas, foi realizada com o programa estatístico Prisma[®] (Graph Pad 6.01, USA). Diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelos testes de Dunnett, e os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

De um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho revelaram que o AMC afetou as raízes, caules e folhas de soja. O comprimento das raízes foi reduzido em 25,3% e 27,5% nos tratamentos com 100 e 250 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 8).

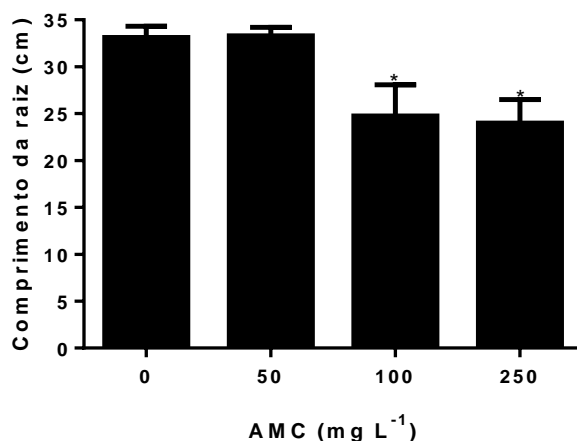


Figura 8. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre o comprimento das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A biomassa fresca das raízes foi mais severamente afetada; 55% com 50 mg L⁻¹, 39,7% com 100 mg L⁻¹, e nenhum efeito com 250 mg L⁻¹ (Figura 9). A biomassa seca das raízes foi reduzida apenas com 50 mg L⁻¹ de AMC (Figura 10).

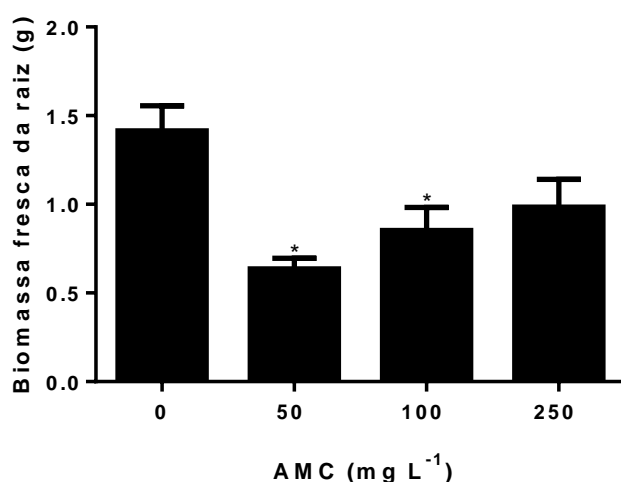


Figura 9. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 10 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

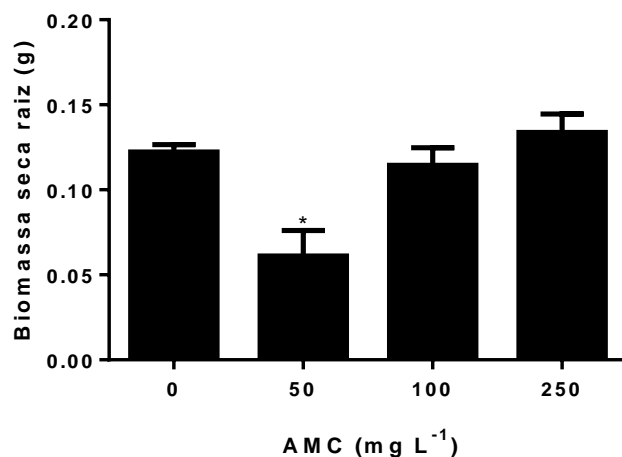


Figura 10. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca das raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

O comprimento dos caules foi reduzido, em média, 23,4% em resposta aos tratamentos com 50, 100 e 250 mg L⁻¹ de AMC (Figura 11).

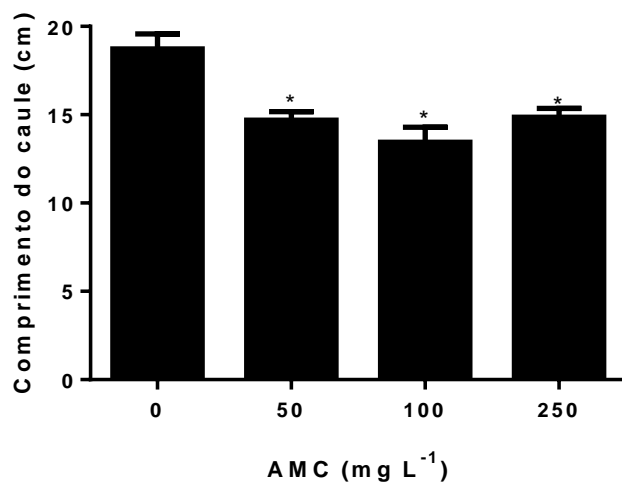


Figura 11. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre o comprimento dos caules de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A biomassa fresca dos caules foi reduzida de modo dependente da concentração, sendo a maior inibição (38,2%) observada com 250 mg L⁻¹ (Figura 12). O AMC não afetou significativamente a biomassa seca dos caules, exceto por uma redução de 31% com 50 mg L⁻¹ (Figura 13).

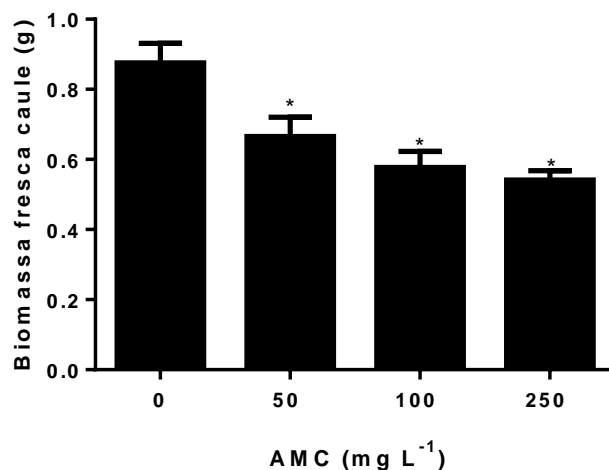


Figura 12. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca de caules de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 10 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

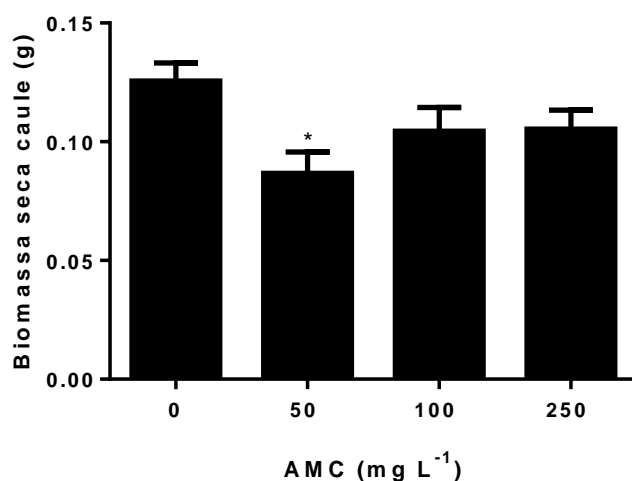


Figura 13. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca de caules de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A área foliar também foi significativamente reduzida: 22,3%, 38,9% e 56,2% com 50, 100 e 250 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 14). As biomassas frescas e secas das folhas foram reduzidas, em média, 90% e 57,2%, independentemente da concentração de AMC utilizada (Figuras 15 e 16).

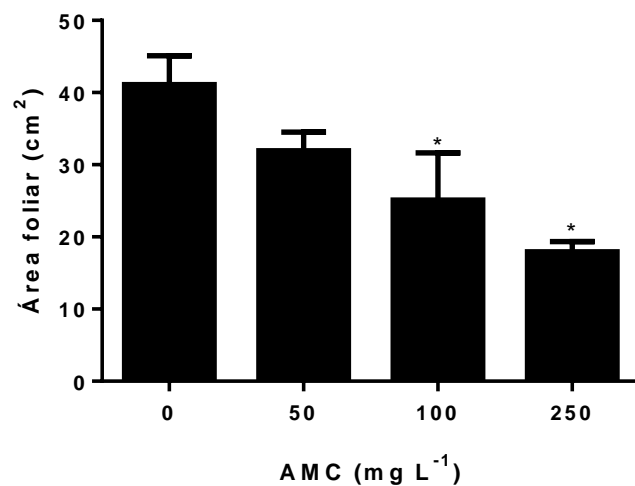


Figura 14. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a área foliar de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

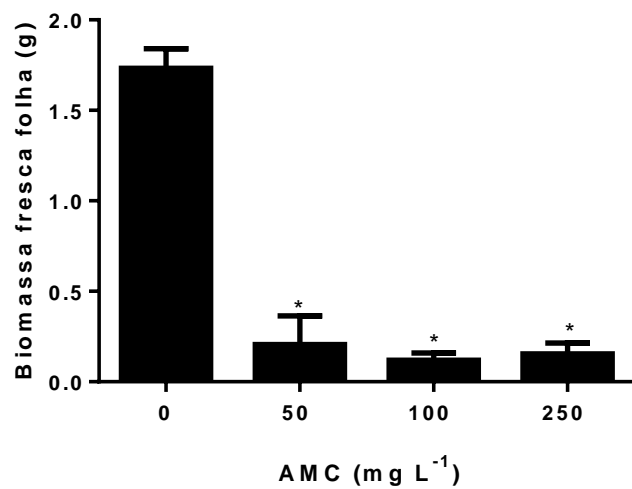


Figura 15. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa fresca de folhas de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

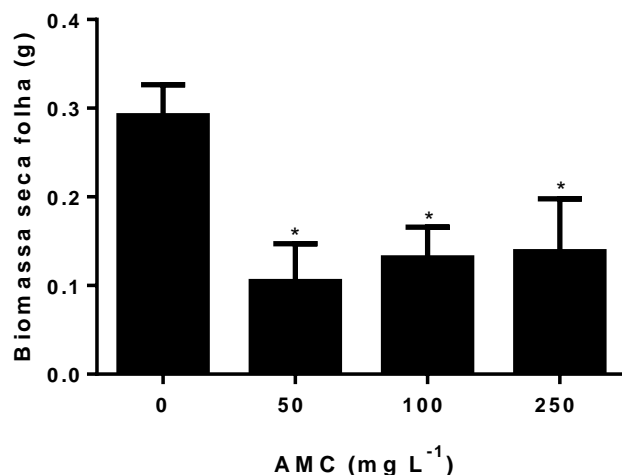


Figura 16. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a biomassa seca de folhas de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

O tratamento com AMC influenciou negativamente a viabilidade das raízes de soja (Figura 17), ou seja, foram observados aumentos de 263% e 233% na liberação do corante NBT a partir das raízes das plantas tratadas com 100 e 250 mg L⁻¹ do composto.

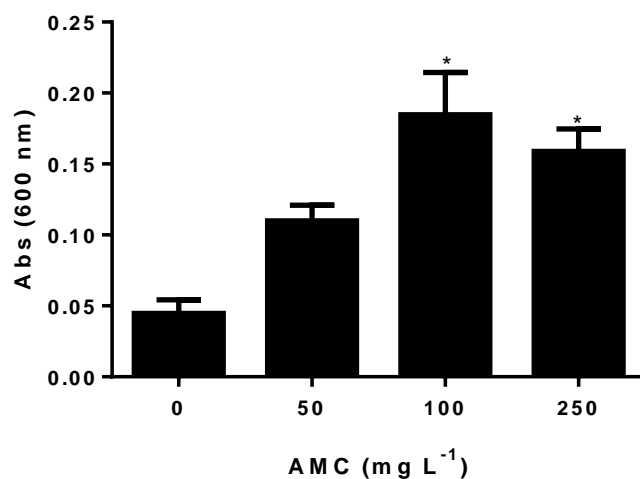


Figura 17. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a viabilidade das células radiculares de plantas soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 10 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A figura 18 mostra os efeitos do AMC quando aplicado diretamente nas folhas de soja. Com intuito de maximizar a absorção o AMC foi aplicado em associação com os adjuvantes Assist[®], Aureo[®] e acetona, sendo estes também aplicados isoladamente como controles (Figuras 18A, B, C). Como esperado, os adjuvantes Assist[®] e Aureo[®] não causaram danos visíveis nas folhas das plantas de soja (Figuras 18A, B), enquanto as plantas borrifadas com acetona apresentaram folhas murchas e com necrose parcial (Figura 18C). Quando o AMC foi aplicado juntamente com Assist[®] (Figura 18D) as plantas de soja não diferiram morfológicamente do controle (Figura 18A), exceto por um estreito enrugamento do ápice de algumas folhas. Entretanto, quando o AMC foi aplicado em associação com Aureo[®] as folhas mais jovens apresentaram-se enrugadas, com necrose nas folhas mais velhas. O tratamento com AMC + acetona resultou em expressiva necrose foliar (Figura 18G).

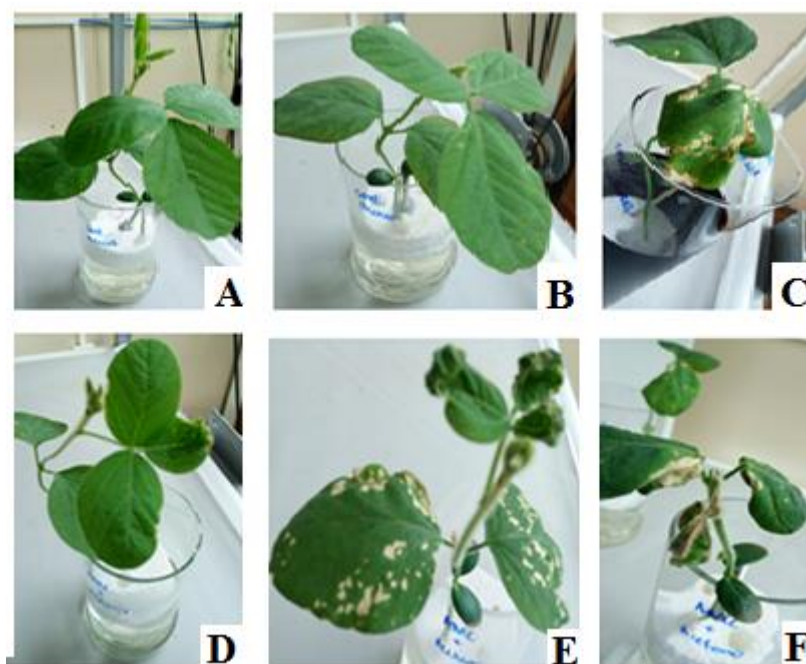


Figura 18. Aplicação foliar de AMC, adjuvantes e acetona. Controle Assist[®] (A); controle Aureo[®] (B); controle acetona (C); AMC + Assist[®] (D); AMC + Aureo[®] (E) e AMC + acetona (F).

O AMC também exerceu significativa influência sobre as atividades de enzimas antioxidantes nas raízes de soja. As atividades da POD e da CAT foram estimuladas, mas

a atividade da SOD foi inibida. O maior aumento na atividade da POD (60%) foi observado com 250 mg L⁻¹ de AMC (Figura 19).

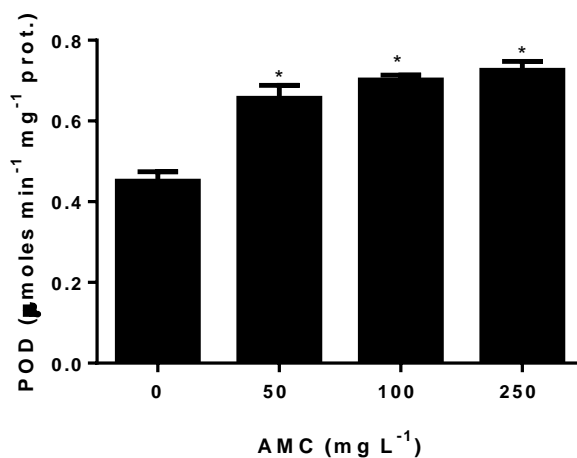


Figura 19. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da peroxidase solúvel (POD) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A atividade da CAT aumentou 139% e 158% com 50 e 100 mg L⁻¹ de AMC, respectivamente, mas não foi afetada no tratamento com 250 mg L⁻¹ (Figura 20).

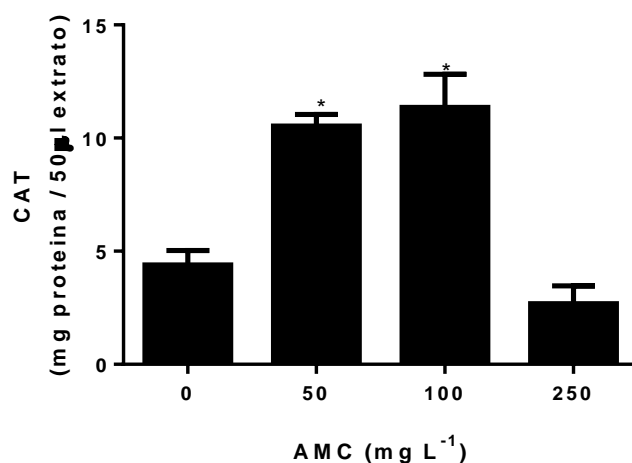


Figura 20. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da catalase (CAT) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 7 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

Finalmente, a atividade da SOD foi reduzida em 78% no tratamento com 100 mg L⁻¹ de AMC, mas não foi alterada com 50 e 250 mg L⁻¹ (Figura 21).

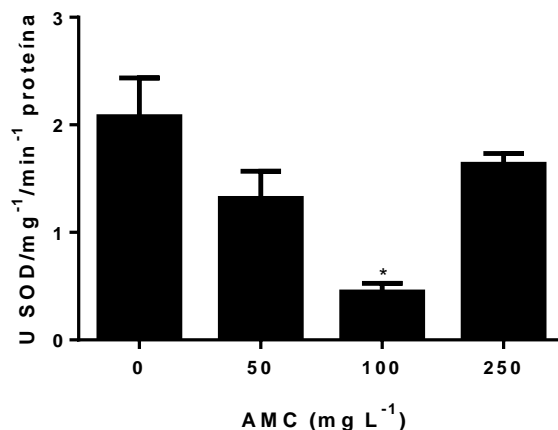


Figura 21. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 7 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A peroxidação lipídica, avaliada pela produção de malondialdeído (MDA), foi reduzida em 58% e 74% com 100 e 250 mg L⁻¹ de AMC, respectivamente (Figura 22).

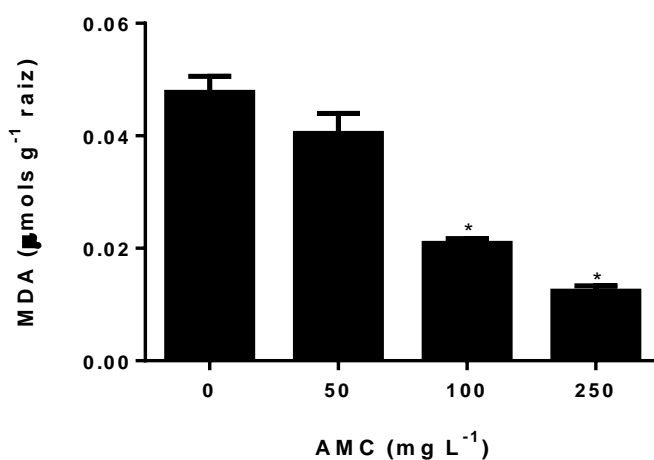


Figura 22. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre o conteúdo de malondialdeído (MDA) de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 4 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

O conteúdo de H₂O₂ aumentou em 19% com 50 mg L⁻¹, reduziu 56,6% com 250 mg L⁻¹ e não foi afetado com 100 mg L⁻¹ de AMC (Figura 23).

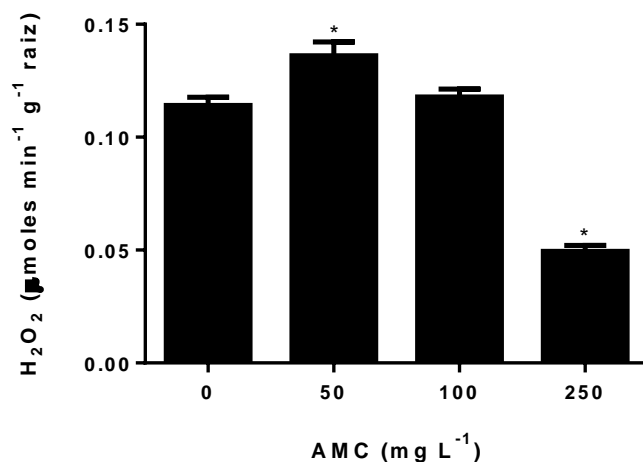


Figura 23. Efeitos do ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) sobre o conteúdo de H₂O₂ de raízes de soja com 14 dias de desenvolvimento. Médias ($n = 5 \pm$ erro padrão da média) seguidas de asterisco diferem estatisticamente do controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

A produção de EROS foi também avaliada por microscopia confocal. Para isso foi utilizado o marcador fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) que reage com diversas EROS, incluindo H₂O₂, radical hidroxil (OH•) e peroxinitrito (ONOO⁻). O H₂DCFDA se difunde inicialmente através da membrana, sendo retido no meio intracelular por clivagens efetuadas por esterases. Em seguida, o composto não fluorescente é oxidado pelas EROS para produzir um produto altamente fluorescente a 488 nm, o 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Ápices radiculares (Figura 24B) de soja tratada com AMC e suas secções transversais (Figura 24D) apresentaram intensa fluorescência, quando comparadas com os seus respectivos controles (Figuras 24A,C), sugerindo significativa formação de EROS.

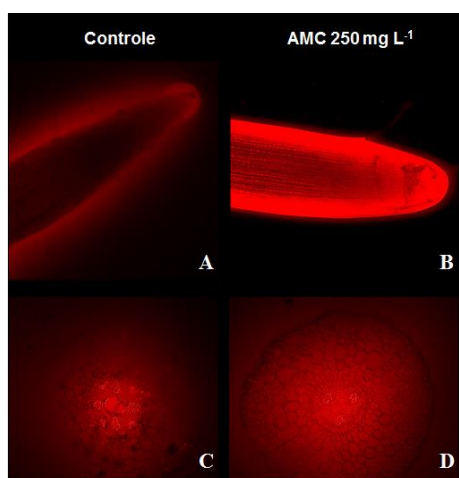


Figura 24. Microscopia confocal de EROS em raízes de soja. Ápices radiculares e secções transversais controles (A, B) e submetidas ao AMC 250 mg L⁻¹.

5. DISCUSSÃO

De um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho indicam que, sob estresse causado pelo aleloquímico AMC, os comprimentos das raízes e caules de plantas de soja foram claramente afetados (Figuras 8 e 11). Além disto, reduções significativas foram constatadas nas biomassas frescas (Figuras 9 e 12), porém com pouca influência sobre as biomassas secas (Figuras 10 e 13). As folhas de soja também foram afetadas pelo AMC; a área foliar (Figura 14) e as biomassas frescas (Figura 15) e secas (Figura 16) foram reduzidas. Comparativamente, as biomassas das folhas foram afetadas em maior proporção que das raízes e dos caules. Embora o AMC tenha sido testado pela primeira vez em soja, efeitos como os descritos neste trabalho são comuns em outras plantas. De fato, plantas sensíveis aos diferentes compostos oriundos do metabolismo secundário, e referidos como aleloquímicos, sofrem redução do crescimento quando submetidas a este tipo de estresse (Rizvi e Rizvi, 1992; Souza-Filho, 2006; Razavi, 2011).

Danos causados à célula são avaliados pela determinação da sua viabilidade. A técnica aplicada neste trabalho (Zanardo et al., 2009) é um confiável indicador dos possíveis efeitos intracelulares causados pelos aleloquímicos, quando as variáveis biométricas são afetadas como visto aqui. Os resultados mostram que os efeitos do AMC danificaram células das raízes de soja principalmente nas maiores concentrações testadas (Figura 17). Estes dados estão em concordância com resultados após a ação do ácido *p*-cumárico, um hidroxicinamato, sobre soja (Zanardo et al., 2009), do extrato hidrometanólico de milheto, contendo AMC, sobre soja (Silva, 2013), e do próprio AMC sobre a planta daninha *Euphorbia heterophylla* (Moreira-Vilar, 2016).

Além de causar sérios danos no crescimento das plantas com perda da viabilidade celular, a aplicação foliar de AMC, juntamente com adjuvantes capazes de auxiliar sua absorção, também afetou as plantas de soja (Figura 18). A aplicação conjunta de AMC com Aureo[®] ou com acetona causou relevante necrose nas folhas, fato similar ao que ocorre com a aplicação de herbicidas, em geral.

Em nível celular, o estresse causado pelo AMC afetou as atividades de enzimas antioxidantes, a peroxidação lipídica e a produção de EROS. Em geral, as atividades de POD e CAT aumentaram (Figuras 19 e 20); SOD reduziu com 100 mg L⁻¹ de AMC (Figura 21), a peroxidação lipídica foi reduzida (Figura 22) e a produção de EROS avaliada por microscopia confocal, aumentou (Figura 24). É sabido que o estresse

oxidativo se caracteriza por uma cascata de eventos que são prejudiciais as plantas, onde EROS indiscriminadamente atingem qualquer macromolécula e alteram a sua funcionalidade Martinez-Cayuela (1998). Além disto, Mittler (2002) reportou que nas plantas as enzimas SOD, POD e CAT compõem uma maquinaria defensiva, cujo objetivo é proteger as células dos danos oxidativos. Estas enzimas atuam conjuntamente para a eliminação de EROS. Inicialmente, SOD atua como a primeira linha de defesa contra ROS convertendo superóxido (O_2°) em H_2O_2 . Subsequentemente, ambas POD e CAT convertem H_2O_2 em H_2O (Apel e Hirt, 2004). No presente trabalho, as atividades da POD e CAT foram significativamente aumentadas após exposição das plantas ao AMC, e estes aumentos foram associados com um decréscimo no teor de H_2O_2 , ao menos na maior concentração de AMC (Figura 23). A observação de que este tipo de ROS foi reduzido é corroborado pela redução nos níveis de peroxidação lipídica (Figura 22).

Situações de estresses induzem diferentes alterações no metabolismo oxidativo das plantas. Por exemplo, em plantas tolerantes ao frio os sistemas antioxidantes são mais atuantes na eliminação de EROS do que em plantas sensíveis a esta alteração climática (Sala, 1998; Wismer, 2003). Num outro exemplo, sob a ação de cádmio, a atividade da CAT é reduzida em *Phaseolus aureus* (Shaw, 1995), *Pisum sativum* (Daleurzo et al., 1997), *Lemna minor* (Mohan et al., 1997), *Helianthus annuus* (Gallego et al., 1999) e *Amaranthus lividus* (Bhattacharjee, 1998). Em adição, Willadino e colaboradores (2011) avaliaram o estresse salino sobre cana-de-açúcar e observaram melhor proteção da planta contra a ação de EROS, em particular a H_2O_2 , devido a aumento da CAT. Em se tratando de estresse por aleloquímicos, os ácidos *p*-cumárico (Zanardo et al., 2009) e cafeico (Bubna et al., 2011) aumentaram a atividade da POD com associado decréscimo no teor de H_2O_2 . Neste contexto, é possível notar que discrepâncias nas atividades enzimáticas, como visto especialmente no caso da SOD (Figura 21) e nos teores de H_2O_2 (Figura 23) são passíveis de ocorrência. Este comportamento é consistente com a premissa de que há um coordenado e preciso balanço entre SOD, POD e CAT para suprimir EROS. Em geral, quando uma destas enzimas é reduzida em sua atividade, outras são aumentadas (Apel e Hirt, 2004). A possibilidade de que o AMC tenha, de fato, aumentado as atividades de enzimas antioxidantes, como POD e CAT (Figuras 19 e 20), em função da produção de EROS pode ser constatada pelos ensaios de microscopia confocal. Como notado, os ápices radiculares e suas secções transversais (Figura 24A, D) de soja tratada com AMC apresentaram intensa fluorescência, um indicativo da significativa formação de EROS (Joo et al., 2005).

Em resumo, e a partir das observações relatadas neste trabalho, é razoável supor que o AMC afeta o crescimento de plantas de soja, com influência sobre as atividades de enzimas antioxidantes e reflexos sobre a produção de ROS e peroxidação lipídica.

6. CONCLUSÕES

Em nível biométrico, o AMC reduziu o crescimento e as biomassas frescas e secas das plantas, um indicativo de que este aleloquímico exerce deletérios efeitos sobre a soja.

Em nível celular, o AMC causou danos significativos que influenciaram a produção de EROS, detectada por microscopia confocal. A presença de EROS resultou no aumento das atividades de enzimas antioxidantes como POD e CAT, seguidas de redução na peroxidação lipídica e, ao menos parcialmente, nos teores de H₂O₂.

7. REFERÊNCIAS

- AGEITEC – AGENCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fb123vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html>. Acesso em: 05, nov, 2016.
- Allen, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 1049-1054, 1995.
- Almeida, G. D. de; Zucoloto, M.; Zetum, M. C.; Coelho, I.; Sobreir, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomia**, Medellín, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- Almeida, F.S. A alelopatia e as plantas. IAPAR, **Circular**, v.55, 62p, 1993.
- Almeida, F.S. Influência da cobertura morta do plantio direto na biologia do solo. In: Almeida, F.S. *Curso para instrutores em manejo e conservação do solo*. Ponta Grossa: **Iapar /Emater**, 1989, p. 123-146.
- Almeida, F.S. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 221-236. 1991.
- Almeida, F.S. Alelopatia e as plantas. IAPAR, **Circular**, v. 53, 60p, 1988.
- Alscher, R. G.; Erturk, N.; Heath, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- Alves, M. C. S.; Medeiros, S. F.; Innecco, R.; Torres, S. B Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- Apel K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. **Rev. Plant Biol.**, v.55, p. 373-399, 2004.
- Asada, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and Antioxidant Defense System in Sunflower Cotyledons. **Biol. Plant.**, v. 42, p. 49–55, 1999.
- Azevedo, R. A. A., R. M.; 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.
- Azevedo, V. M. Ação combinada de fatores abióticos de estresse em cana-de-açúcar: Variáveis fisiológicas e bioquímicas. Recife. 2013. 98p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Bagchi, G.D.; Jain, D.C.; Kumar, P.O. Arteether: a potente plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v.45, n.6, p.1131-3, 1997.
- Baziramakenga, R.; Leroux, G. D.; Simard, R. R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **J. Chem. Ecol.** V.21, p. 1271–1285, 1995.
- Bhattacharjee, S. Membrane Lipid Peroxidation, Free Radical Scavengers, and Ethylene Evolution in Amaranthus as Affected by Lead and Cadmium. **Biol. Plant.** v. 40, p. 131–135, 1998.
- Blokhina, o.; virolainen, e.; fagerstedt, k. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.

- Brown, S. T. Biosynthesis of Coumarins. Biosynthesis of Aromatic compounds. Proceedings of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. In: **Billek, G.** (Ed.). v.1, cap. 2, Vienna: Pergamon, p.15-20, 1965.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytica Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 19, p. 47-64.
- Bubna, G. A.; Lima, R. B.; Zanardo, D. Y. L.; Dos 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*). **J. Plant Physiol.** 2011, doi:10.1016/j.jplph.2011.03.005.
- Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants. Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, p. 1367, 2000.
- Brum, A. L.; Heck, C. R.; Lemes, C. L.; Müller, P. K. A economia mundial da soja: impactos na cadeia produtiva da oleaginosa no Rio Grande do Sul 1970-2000. **Anais dos Congressos**. XLIII Congresso da Sober em Ribeirão Preto. São Paulo, 2005.
- CNA - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.cnabrazil.org.br/>. Acesso em: 16 de mar de 2017.
- Castro, P. R. C.; Sena, J. O. A.; Kluge, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002.
- Chon, S.U. Allelopathic and autotoxic effects of alfalfa plant and soil extracts. **Korean Journal of Crop Science**, v.49,n.1, p.7-11, 2004.
- Cazetta, D. A.; Fornasieri Filho, D.; Giroto, F. Composição, produção de matéria seca e cobertura do solo em cultivo exclusivo e consorciado de milho e crotalária. **Acta Sci. Agron.**, v. 27, p. 575-580, 2005.
- Campa, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B. (Ed.). Peroxidases in chemistry and biology. **Boca Raton: CRC Press.**, p. 25-50, 1991.
- Carvalho, G. J.; Fontanetti, A. A.; Cancado, C. T. Potencial alelopático do feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) e da mucuna preta (*Stylosobium aterrimum*) no controle da tiririca (*Cyperus rotundus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 647-651, 2002.
- Carvalho, S. I. C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris cv. Bandeirante**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Carvalho, F. E. L.; Lobo, A. K. M.; Bonifacio, A.; Martins, M. O.; Lima Neto, M. C.; Silveira, J. A. G. Aclimação Ao Estresse Salino Em Plantas De Arroz Induzida Pelo pré-tratamento de H₂O₂. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, v.15, p.416-423, 2011.
- Cia, M. C.; Guimarães, A. C. R.; Medici, L. O.; Chabregas, S. M.; Azevedo, R. A. Antioxidant responses to water deficit by droughttolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v.161, p.313-324, 2012.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos. Acesso em 16 de mar, 2017.
- Costa, K. A. De P.; Assis, R. L. De; Perim, R. C.; Guimarães, K. C.; Paludo, A.; Privado, C. J. T.; Vieira, T. P. Quality and nutritional value of pearl millet genotypes silage

- produced with and without inoculants. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.286-295, 2011.
- Culotta, V. C. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. **Current Topics in cellular regulation**, v. 36, p. 117- 132, 2001.
- Dalurzo, H. C.; Sandalio, L. M.; Gomez, M.; Del Rio, L. A. Cadmium Infiltration of Detached Pea Leaves: Effect on Its Activated Oxygen Metabolism. **Phyton-Annales Rei Botanicae** 37, p. 59–64, 1997.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 779–795, 2000.
- Dias, J. F. G.; Círio, G. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.
- Durigan, J. C.; Almeida, F. S. Noções sobre a alelopatia. **Boletim Técnico**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 28 p., 1993.
- EMBRAPA – SOJA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>. Acesso em: 05, nov, 2016.
- Einhellig, F. A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1995, **Lavras. Anais...** Lavras: UFLA, 1996.
- Ekmekcioglu, C.; Feyertag, J.; Hehlmann, R. Aneuploidy And Cancer: From Correlation To Causation. **Contrib. Microbiol.**, v.13, p.16-44, 2006.
- Facelli, J. M.; Pickett, S. T. A. Plant litter: light interception and effects of an old-field plant community. **Ecology**, v. 72, n. 3, p. 1024-1031, 1991.
- Ferreira, A.; Gui, Et Al. Germinação do básico ao Aplicado. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.
- Ferreira, A. G.; Aquila, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição especial.
- Ferreira, A. G.; Áquila, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Rio Grande do Sul, v.12 Edição Especial, p.175-204, 2000.
- Foyer, C. H.; Descourvieres, P.; Kunert, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environ** v. 17, p. 507–23, 1994.
- Foyer, C. H.; Noctor, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p.355–364, 2003.
- Gallego, S. M.; Benavides, M. P.; Tomaro, M. L. Effect of Cadmium Ions on dissipation of excess photons. **Annu Rev Plant Physiol PlantMol Biol**, v.50, p. 601–39., 1999.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S.K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4ed. **Oxford University Press.**, New York, p. 1 – 851, 2007.
- 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.
- Isaaa, 2010. Disponível em: <http://www.isaaa.org>. Acesso em: 16, mar, 2017.
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. In: **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**. Ithaca, New York, 2010.

- Junghee H. Joo.; Shiyu Wang, J. G.; Chen, A. M. Jones, Nina V.; Fedoroff, A. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. **The Plant Cell**, v. 17, p.957-970, 2005.
- Kissmann, G. K. Plantas daninhas e nocivas. 2. ed. São Bernardo do Campo: **BASF Brasileira**, tomo 1, p. 825, 1997.
- Kollet, J. L.; Diogo, J. M. Da S.; Leite, G. G. Rendimento forrageiro e composição bromatológica de variedades de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1308- 1315, 2006.
- Larcher, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: **RiMa**, 2000.
- Lorenzi, H. Plantas Medicinais no Brasil. São Paulo, **Plantarum**, p.512, 2002.
- Li-Cor. LI 3100 area meter instruction manual. **Lincon**, p.34, 1996.
- Liu, L. Et Al. Cinnamic Acid: A Natural Product With Potential Use In Cancer Intervention. **Int. J. Cancer.**, v.62, n.3, p.345-350, 1995.
- Macedo, F. M.; Martins, G. T.; Rodrigues, C. G.; Oliveira, D. A. Triagem fitoquímica do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1166-1168, 2007.
- Martinez-Cayuela, M. Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v.39, n. 1, p. 5-18, 1998.
- Martins Netto, D. A. A cultura do milho. Sete Lagoas: **Embrapa-CNPMS**, (Comunicado Técnico, 11), p. 6, 1998.
- Martins, R. E.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. Plantas Medicinais. Viçosa-Minas Gerais. **UFV**. p. 220, 2000.
- Mahajan, R., Kaur, D. J., Bajaj, K. L. Nematical activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 20, p. 217-219, 1992.
- Miller, D. A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.**, v.7, p. 405–410, 2002.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490–498, 2004.
- Mohan, B.S.; Hosetti, B.B. Potential Phytotoxicity of Leaf and Cadmium to Lemna minor Grown in Sewage Stabilization Ponds. **Environ. Pollution** 98, p. 233–238, 1997.
- Moreira-Vilar, F. C. **Efeitos do ácido p-metoxicinâmico em raízes de *Euphorbia heterophylla***. 2016. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Oliveira, T. K.; Carvalho, G. J.; Moraes, R N. S. Plantas de cobertura e seus efeitos sobre o feijoeiro em plantio direto. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, p.1079-1087, 2002.
- Pinho, R. M. A.; Santos, E. M.; Rodrigues, J. A. S. Macedo, C. H. O.; Campos, F. S.; Ramos, J. P. De F.; Bezerra, H. F. C.; Perazzo, A. F. Avaliação de genótipos de milho para silagem no semiárido. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, p.426-436, 2013.
- Putnam, A. R.; Duke, W. B., Allelopathy in agroecosystems. **Ann Rev Phytopathol**, v. 16, p.431-451, 1978.
- Razavi, S. M. Plant coumarins as allelopathic agents. **International Journal of Biological Chemistry**, Pakistan, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.
- Resende, M. L. V.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas à patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.
- Rice, E. L., Allelopathy. 2ª edição. New York, EUA: **Academic Press.**, p. 422, 1984.

- Rizvi, S. J. N.; Rizvi, V. Allelopathy: basic and applied aspects. London: **Chapman & Hall**, p. 480, 1992.
- Roessing, A. C., Dall'agnol, A., Lazzarotto, J. J.; Hirakuri, M. H., Oliveira, A. B. O agronegócio da soja no Brasil e no mundo. **Embrapa** - Sistemas de produção 12, Tecnologias de Produção da Soja, região central do Brasil, 280 p., 2008.
- Roessing, A. C.; Sanches, A. C.; Michellon, E. As Perspectivas de Expansão da Soja. **Anais dos Congressos**. XLIII Congresso da Sober em Ribeirão Preto. São Paulo, 2005.
- Rodrigues, F.C.M.P.; Lopes, B.M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**. v.8, n.1, p.130-136, 2001.
- Rodrigues, L. R. A.; Almeida, A. R. P.; Rodrigues, T. J. D. Alelopatia em forrageiras e pastagens. In: Simpósio sobre ecossistema de pastagens, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais... Jaboticabal**: FUNEP, 1993.
- Strack, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M. e HARBONE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. San Diego/London: Academic Press. p.387-416, 1998.
- Scaléa, M. J. Perguntas & respostas sobre o plantio direto. **Informações Agronômicas**, v. 83, p. 1-8, 1998.
- Silva, P. C. et al. Milheto (*Pennisetum americanum*) como substituto do milho (*Zea mays*) na alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **B. Inst. P.**, v. 24, p. 125-131, 1996.
- Silva, H. A. **Atividade da fração hidrometanólica de milheto sobre o metabolismo e crescimento de *Euphorbia heterophylla***. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Silva, P. B. Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico. Rio Largo. 2010. 98p. Dissertação Mestrado – UFAL.
- Sala, J. M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.255-261, 1998.
- Sampietro, D. A. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Disponível em: <http://fai.enne.edu.ar/biologia/alelopatia/alelopatia.htm>. Acesso em: 05 ago. 2001.
- Santos, S. R. N.; Lima, C. R.; Silva, K. R. G.; Júnior, J. M. B. Produção de sementes oleaginosas. Disponível em: <http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNNEPI2010/paper/viewFile/1307/852>. Acesso em: 20 out, 2016.
- Scandalios, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.
- Scandalios, J. Oxidative stress responses - What have genome-scale studies taught us?. **Genome Biology**, v. 3, p. 1–6, 2002.
- Shaw, B. P. Effects of Mercury and Cadmium on the Activities of Antioxidative Enzymes in the Seedlings of *Phaseolus aureus*. **Biol. Plant**. 37, p. 587–596, 1995.
- Silva, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. **Boletim Geográfico**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.
- Soriano, U. M. Alelopatia. 1996. Disponível em: <http://mailweb.pue.udlap.mx/aleph/alephzero6/alelopatia.htm> Acesso em: 10 ago, 2016.
- Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M.; Figueiredo, F. J. C. Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e densidade de sementes da planta receptora. **Planta daninha**, Viçosa, v.21, n.2, p.211-218, 2003.

- Souza-Filho, A. P. Da S. Alelopatia e as plantas. Belém: **Embrapa** Amazônia Oriental, p. 159, 2006.
- Szczepanski, A. J., Allelopathy as a means of biological control of water weeds. **Aquatic Bot**, v. 3, p.193-197, 1977.
- Teasdale, J. R.; Mohler, C. L. Light transmittance, soil temperature, and soil moisture under residue of hairy vetch and rye. **Agron. J.**, v. 85, n. 3, p. 673-680, 1993.
- Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Trezzi, M. M.; Vidal, R. A. Potencial de utilização de cobertura vegetal de sorgo e milheto na supressão de plantas daninhas em condição de campo: II efeitos da cobertura morta. **Planta Daninha**, v. 22, p. 1-10, 2004.
- Vidal, R. A. **Amount of crop residues in no-till farming affects weed-crop ecosystems**. 1995. 161 f. Thesis (Ph.D.) – Purdue University, West Laffayette, 1995.
- Vidal, R. A.; Trezzi, M. M. Potencial da utilização de coberturas vegetais de sorgo e milheto na supressão de plantas daninhas em condição de campo: I - plantas em desenvolvimento vegetativo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 217-224, 2004.
- 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 and Experimental Botany**, v. 66, p. 25-30, 2009.
- Whittaker, R. H.; Feeny, P. P. Allelochemicals: chemical interaction between species. **Science**, [S.l.], v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.
- Willadino, L.; Oliveira Filho, R. A. De; Silva Júnior, E. A. Da; Gouveia Neto, A. G.; Camara, T. R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: Enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p.417-422, 2011.
- Wismer, W. V. Low temperature as a causative agent of oxidative stress in postharvest crops. In: HODGES, D.M. Postharvest oxidative stress in horticultural crops. New York: **Food Product Press**, p. 266, 2003.
- Yu, J. Q., Matsui, Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 817-827, 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, n. 2, p. 29-139, 2003.