

RAFAELA CARVALHO TIGRE

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.
SOBRE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE
Lactuca sativa L.**

RECIFE
2009

RAFAELA CARVALHO TIGRE

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.
SOBRE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE
Lactuca sativa L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica – CCB – UFPE, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIOLOGIA VEGETAL, na Área de Concentração de Florística e Sistemática.

Orientador: Dr^a. Eugênia Cristina G. Pereira

Co-Orientador: Dr. Mauro Guida dos Santos

RECIFE
2009

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Tigre, Rafaela Carvalho

Atividades alelopática de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. Sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. / Rafaela Carvalho Tigre. – Recife: O Autor, 2015.

141 f.: il.

Orientadores: Eugênia Cristina G. Pereira, Mauro Guida dos Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Alelopatia 2. Líquens I. Pereira, Eugênia Cristina G. (orient.) II. Santos, Mauro Guida dos (coorient.) III. Título.

581

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-105

RAFAELA CARVALHO TIGRE

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.
SOBRE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE
Lactuca sativa L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica – CCB – UFPE, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIOLOGIA VEGETAL, na Área de Concentração de Florística e Sistemática.

Aprovada em 16/02/2009 pela Banca Examinadora:

Dra. Profa Eugênia Cristina G. Pereira
Orientadora UFPE

Prof. Dr. Antonio Fernando Moraes de Oliveira
1º examinador

Profa. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno
2º examinador

RECIFE
2009

*Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o
homem que obtém entendimento,
pois a sabedoria é mais proveitosa do que a
prata e rende mais do que o ouro.*

Provérbios 3:13-14

*Á Deus, toda honra, toda
Glória e todo louvor,*

E á minha família,

Dedico com amor!

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre me conduzir de maneira surpreendente aos Seus propósitos para minha vida, pela sua fidelidade e seu amor indescritível por mim.

A minha família, pela minha formação pessoal, por todo esforço e sacrifício que fizeram para que eu chegasse aqui! À minha mãe, pelo seu amor e apoio incondicional.

A minha orientadora, Profa. Eugênia, pela qual eu tenho grande admiração, obrigada pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos, conselhos e amizade!

Ao Prof. Nicácio pela amizade e por todo seu cuidado e atenção em ensinar as técnicas de cromatografia e ensinamentos químicos.

Ao Prof. Mauro Guida pela oportunidade, confiança e uso do laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

Ao técnico do laboratório de Produtos Naturais, João, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grande “amiguinho” Marciel por estar sempre disposto a ajudar, por todas as conversas, sinceridade, sorrisos, ensinamentos e amizade.

Ao meu amigo Alexandre por ter sido instrumento para que eu pudesse ter a oportunidade de conhecer este mestrado e por ter me acompanhado durante este tempo.

Ao secretário Hildebrando pela colaboração e ajuda com as documentações sempre que necessárias as disciplinas e defesa.

Ao Prof. Peter pela ajuda nas análises cromatográficas.

A todos os amigos do laboratório de Produtos Naturais e do laboratório de Ecofisiologia Vegetal pela amizade e por tornarem os dias mais agradáveis durante a pesquisa.

Ao Prof. Clemens Schlindwein por disponibilizar a lupa do seu laboratório para obtenção das fotos e caracterização morfológica das plântulas.

A Profa. Regina Bressan e ao instituto Aggeu Magalhães pela disposição e ajuda na análise de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Fernando e a Profa. Riselane por aceitarem gentilmente o convite para participar da banca.

À Capes pela bolsa de mestrado. A Universidade Federal de Pernambuco e a Pós-Graduação de Biologia Vegetal pela oportunidade de cursar em um programa de tamanha qualidade.

Muito obrigada!!!!

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
APRESENTAÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Alelopatia	14
2.1.1. Natureza e função das substâncias alelopáticas.....	16
2.1.2 Mecanismos de ação e funções dos aleloquímicos.....	17
2.1.3. Aplicações da alelopatia como bioherbicida	20
2.2 Líquen.....	23
2.2.1 Substâncias liquênicas: importância econômica e ecológica	24
2.2.2. Potencial alelopático dos fungos liquenizados	28
2.2.3 <i>Cladonia verticillaris</i>	32
2.2.3.1 Ácido fumarprotocetrárico	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 1 (Potencial Alelopático de Extratos Orgânicos de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. na Germinação e no Crescimento Inicial de <i>Lactuca sativa</i> L.).....	54
CAPÍTULO 2 (Potencial alelopático de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr.).....	83
CAPÍTULO 3 (Bioatividade dos Aleloquímicos de <i>Cladonia verticillaris</i> sobre a Germinação e Crescimento Inicial de <i>Lactuca sativa</i> L.)	102

CONCLUSÃO	123
RESUMO	124
ABSTRACT	125
ANEXOS	126

Lista de Tabelas

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Herbicidas desenvolvidos a partir de aleloquímicos naturais.....	24
Tabela 2. Potencialidades pesticidas de metabólitos liquênicos. Fonte: Dayan & Romagni (2001).....	34

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Resultado da análise de variância da germinabilidade e da primeira contagem dos aquênios de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	62
Tabela 2. Resultado da análise de variância do tempo médio e do IVG dos aquênios de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	64
Tabela 3. Resultado da análise de variância do comprimento do hipocótilo e da radícula dos aquênios de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	66
Tabela 4. Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de <i>Cladonia verticillaris</i> sob <i>Lactuca sativa</i> quando submetidas às doses crescentes dos extratos.	70
Tabela 5. Resultado da análise de variância do comprimento, largura e área foliar das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	74

Tabela 6. Resultado das análises dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> a uma concentração de 1 mg/mL submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência	77
---	-----------

Tabela 7. Características dos pHs médios dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> a uma concentração de 5 mg/mL	78
---	-----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resultado da análise de variância do comprimento do hipocótilo, da radícula e da biomassa das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	91
---	-----------

Tabela 2. Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de <i>Cladonia verticillaris</i> sobre <i>Lactuca sativa</i> quando submetidas às doses crescentes dos extratos.	94
--	-----------

Tabela 3. Resultado da análise de variância do comprimento, largura e área foliar das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (0%).	96
---	-----------

Tabela 4. Valores de pH dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> na concentração 5,0 mg/mL	99
--	-----------

Tabela 5. Resultado das análises dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	99
--	-----------

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Valores médios da germinabilidade, primeira contagem, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio (T.M) dos aquênios de <i>Lactuca sativa</i> submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e ácido protocetrárico (PRO) de <i>Cladonia verticillaris</i>	111
---	------------

Tabela 2. Resultado das análises dos aleloquímicos de <i>Cladonia verticillaris</i> submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência.....	120
--	------------

Lista de Figuras

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1.** Alteração de processos fisiológicos causados por aleloquímicos sobre a planta alvo. Fonte: adaptado de Einhellig (2004).....25
- Figura 2.** Corte transversal de *Canomaculina pilosa* (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (Fonte: Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica - UFPR). Aumento de 1000 x.....30
- Figura 3.** Classes de compostos liquênicos organizados de acordo com sua origem Biossintética. Fonte: Adaptado de Dayan & Romagni (2001).....31
- Figura 4.** *Cladonia verticillaris* em seu habitat.....37
- Figura 5.** Modelo estrutural do ácido fumarprotocetrárico (a) e protocetrárico (b).....40
- Figura 6.** Reação entre 3-metil ácido orselínico e ácido fumárico para obtenção do ácido fumarprotocetrárico. Fonte: Honda, 1997.41
- Figura 7.** Reação de formação do ácido fumarprotocetrárico por esterificação do grupo CH₂OH da posição 3' do ácido protocetrárico com ácido fumárico. Fonte: Honda, 1997.41
- Figura 8.** Modelo estrutural do ácido hipoprotocetrárico.....42
- Figura 9.** Modelo estrutural da atranorina.....42

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Valores médios de percentagem de germinação (A) e primeira contagem (B) dos aquênios de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle

(CNC). A. Plântulas com sete dias de idade. B. Plântulas com três dias de idade	65
Figura 2. Valores médios do índice de velocidade de germinação (A) e do tempo médio (B) das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. submetidas por sete dias à ação de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....	67
Figura 3. Valores médios do comprimento hipocotilar e radicular de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> crescidas durante sete dias na presença de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> em cinco concentrações, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....	69
Figura 4. Plântulas de <i>Lactuca sativa</i> com estímulo do comprimento radicular induzido por extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> , após sete dias de experimento. A. Tratamento com extrato etéreo 2,5 mg/mL; B. Tratamento com extrato clorofórmico 2,5 mg/mL.	71
Figura 5. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das raízes de <i>Lactuca sativa</i> , submetidas a extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> com 4 dias de germinação. A. Controle com visualização do ápice radicular e zona pilífera. B. Ápice radicular do controle. C - D. Alterações micromorfológicas induzidas pelo extrato acetônico 2,5 mg/mL. C. Ausência de pêlos, raiz comprida e delgada. D. Células apicais deterioradas em relação ao controle (B).	73
Figura 6. Toxicidade das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas a doses crescentes dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> . A. Controle com três dias, presença de pêlos; B. Raízes encurvadas do tratamento acetônico 5,0 mg/mL com três dias; C. Radícula oxidada e hipocótilo encurvando-se no tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL; D e E. Anormalidade das plântulas no tratamento acetônico 5,0 mg/mL com sete dias; F. Estrangulamento da radícula e desenvolvimento de radícula longa e muito fina no tratamento 2,5 mg/mL;	

G. Necrose radicular no tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL; H. Necrose na raiz primária e na secundária no tratamento etéreo 5,0 mg/mL; I. Detalhe da necrose apical do tratamento 5,0 mg/mL do extrato etéreo.....	74
Figura 7. Valores médios do comprimento (A), da largura foliar (B) e da área foliar (C) de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> crescidas durante sete dias na presença de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i>	77
Figura 8. CCD dos extratos e padrões de <i>Cladonia verticillaris</i> . 1. Extrato etéreo. 2. Extrato clorofórmico. 3. Extrato acetônico. 4. PRO. 5. FUM. 6. ATR.	78
Figura 9. Curva de calibração para quantificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) a esquerda e do ácido protocetrárico (PRO) a direita	79
Figura 10. Cromatogramas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> a uma concentração de 1 mg/mL. A. Extrato etéreo. B. Extrato clorofórmico. C. Extrato acetônico.....	80

CAPÍTULO 2

Figura 1. Valores médios da biomassa (A) e do comprimento hipocotilar e radicular (B) de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> crescidas por dez dias em doses crescentes de diferentes extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> , mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	94
Figura 2. Plântulas de <i>Lactuca sativa</i> submetidas a doses crescentes dos extratos de <i>Cladonia verticillaris</i> . A. Controle; B. Tratamento etéreo 0,01 mg/mL, com raízes secundárias longas e folhas largas. C. Tratamento etéreo 0,1 mg/mL, com radícula comprida sem raiz secundária e sem pêlos. D. Tratamento etéreo 1,0 mg/mL, com raízes secundárias médias e eófilo bem desenvolvido. E. Tratamento clorofórmico 0,01 mg/mL com raízes secundárias longas. F. Tratamento clorofórmico 1,0 mg/mL; G. Tratamento clorofórmico 2,5 mg/mL; H. Tratamento acetônico 0,01 mg/mL, sem eófilos; I. Tratamento acetônico 0,1 mg/mL, Plântula bem	

desenvolvida com eófilo grande e radícula normal; **J.** Tratamento acetônico 1,0 mg/mL, com radícula muito grande; **K.** Tratamento acetônico 2,5 mg/mL, com radícula extremamente fina, frágil e escura; **L.** tratamento acetônico 5,0 mg/mL, com radícula escura e eófilo desenvolvido.95

Figura 3. Toxicidade das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos extratos de *Cladonia verticillaris* na concentração 5,0 mg/mL. **A e B.** Tratamento clorofórmico, raízes escuras e amolecidas, região apical muito fina e oxidada, espessamento na base; **C e E.** Radícula escura e amolecida, raízes secundárias pequenas, necroses apicais e hipocótilo enrolado. **D e F.** Tratamento etéreo, raízes secundárias pequenas e outras médias, necrose apical, espessamento na base radicular e região apical extremamente fina.....96

Figura 4. Plântulas anormais de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos extratos de *Cladonia verticillaris*. **A - D.** À esquerda é o controle **A.** tratamento acetônico 5,0 mg/mL; **B.** Tratamento acetônico com raiz secundária muito longa e raiz principal fina no ápice. **C.** Tratamento acetônico 2,5 mg/mL, com radícula muito longa, fina e escurecida; **D.** Tratamento etéreo 5mg/mL, com hipocótilo enrolado e radícula frágil; **E.** Tratamento etéreo 5,0 mg/mL. **F.** Tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL, com radícula inibida e oxidada.....98

Figura 5. Valores médios do comprimento (A), da largura foliar (B) e da área foliar (C) de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes doses de extratos de *Cladonia verticillaris*, mais o controle (CNC), durante dez dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.99

Figura 6. Cromatogramas para quantificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) nos extratos etéreos (A), cloroformico (B) e acetônico (C) a uma concentração de 1 mg/mL.102

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Valores médios do hipocótilo e da radícula de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* no processo germinativo, durante sete dias. 115
- Figura 2.** Toxicidade das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* comparadas ao controle (CNC). Plântulas com sete dias de idade. **A.** Plântulas submetidas ao ácido protocetrárico (PRO) 0,01mg/mL com radículas finas no ápice, presença de pêlos radiculares no controle. **B.** Plântulas com PRO 0,01 mg/mL, com raízes laterais. **C.** Plântulas com PRO 0,1 mg/mL demonstrando raízes laterais. **D.** Plântulas com ácido fumarprotocetrárico (FUM) 0,01mg/mL mostrando raízes laterais e radículas apicais finas. **E-G.** Plântulas com FUM mostrando raízes longas e finas. **E.** FUM 0,1mg/mL. **F.** FUM 1,0mg/mL. **G.** FUM 2,5mg/mL. 115
- Figura 3.** Valores médios do crescimento foliar das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* durante o processo de germinação. Plântulas com sete dias de idade. 116
- Figura 4.** Valores médios do comprimento da radícula e do hipocótilo de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes do ácido fumarprotocetrárico e do ácido protocetrárico de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade..... 117
- Figura 5.** Valores médios do comprimento foliar de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade. 119
- Figura 6.** Valores médios da massa seca de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do

ácido protocetrário (PRO) de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade..... **119**

Figura 7. Cromatogramas de cromatografia líquida de alta eficiência dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*. **A.** Ácido protocetrário (PRO). **B.** Ácido fumarprotocetrário (FUM)..... **122**

Figura 8. Curvas de calibração dos ácidos fumarprotocetrário (FUM) e protocetrário (PRO) obtidas por CLAE. Calibração direta do FUM: $y = 26090x + 255,33$; $r^2 = 0,9766$ e do PRO: $y = 372578x - 60,256$; $r^2 = 0,9697$. Dados resultantes de três replicatas..... **123**

APRESENTAÇÃO

Ao longo dos anos, tem-se comprovado que as plantas produzem substâncias com propriedades que afetam, benéfica ou maleficamente, outras espécies. A esse fenômeno deu-se o nome de alelopatia e às substâncias responsáveis por essas propriedades, de aleloquímicos. Esses compostos são encontrados distribuídos em concentrações variadas nas diferentes partes da planta, e durante o seu ciclo de vida. Os aleloquímicos, quando liberados em quantidades suficientes, causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microrganismos (Carvalho, 1993). Os efeitos alelopáticos são mediados por compostos secundários pertencentes a diversas classes como fenóis, terpenos, alcalóides, taninos, cumarinas, esteróides, flavonóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, dentre outros (Putnam & Duke, 1978).

Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são produtos do metabolismo secundário, denominados aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou apenas produtos ou metabólitos secundários. As principais formas de liberação dessas substâncias no ambiente ocorrem através dos processos de volatilização, exsudação pelas raízes, lixiviação e decomposição dos resíduos (Durigan & Almeida, 1993). Esse fenômeno envolve complexa cadeia de comunicação química entre as espécies (Harborne, 1993).

Aparentemente a produção dessas substâncias não possui função fisiológica equivalente a dos metabólitos primários, mas sim uma importante função ecológica que foi desenvolvida através da evolução dos mecanismos de defesa dos organismos, que ao longo deste processo adquiriram enorme capacidade para sintetizar, acumular e excretar uma variedade desses metabólitos secundários. Entretanto, com os avanços na química de Produtos Naturais, diferenças qualitativas e quantitativas destes compostos têm-se tornado evidentes e explicam a função destes nos processos ecológicos naturais (Siqueira *et al.*, 1991).

Diferentes grupamentos químicos podem ser os responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados entre os organismos (Medeiros, 1990; Einhellig, 2002). Estes efeitos resultam da ação combinada dos grupos de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos (Rice, 1984; Putnan & Tang, 1986; Inderjit & Dakshini, 1995; Chou, 1999; Reigosa *et al.*, 1999; Einhellig, 2002) por função defensiva, que vem sendo

adquirida ao longo de um processo de evolução (Harbone, 1997; Nishimura & Mizutani, 1995), podendo apresentar ação direta ou indireta sobre o indivíduo alvo (Molisch, 1937). Os efeitos indiretos são evidenciados nas alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o solo. Os diretos, por sua vez, são mais estudados e compreendem o atraso ou a inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, injúria no sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas. Estes efeitos visíveis dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores como: alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras (Rice, 1984; Rizvi & Rizvi, 1992; Reigosa *et al.*, 1999).

A produção de aleloquímicos pode ser regulada por diversos fatores ambientais, como a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e microrganismos presentes (Chou, 1986). Além disso, os fatores relacionados ao estresse podem aumentar a atividade biológica referente aos aleloquímicos. O tempo de residência, persistência e transformação dos aleloquímicos pode aumentar, diminuir ou fazer cessar o efeito alelopático, pela ação de microrganismos no solo. Inclusive, o próprio andamento diário do metabolismo primário, com formação de cadeias carbonadas que variam nas diferentes horas do dia, tem repercussões no metabolismo secundário.

A resistência ou tolerância a estes compostos é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática.

Segundo Chou (1986; 1999), a alelopatia tem sido reconhecida como importante mecanismo ecológico, que influencia a dominância e sucessão das plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas.

Os líquens ou fungos liquenizados, associação simbiótica entre um micobionte (fungo) e um fotobionte (alga ou cianobactéria), estão presentes em quase todos os ecossistemas, apenas as bactérias têm maior dispersão. Esses organismos simbiontes estão ausentes apenas em ambientes constantemente úmidos e/ou sombreados, como no interior de matas tropicais mais densas, ou então de regiões cujo ar esteja poluído. Estes organismos

simbiontes apresentam muitas substâncias eficientes de utilização biológica, como atividade alelopática, farmacológica, antineoplásica, antimicrobiana, entre outros (Xavier-Filho *et al.*, 2006).

Estudos realizados através da aplicação de extratos brutos e substâncias puras de vários líquens da família Cladoniaceae, ocorrentes em tabuleiros arenosos do Nordeste do Brasil, revelaram que estes simbiontes interferem na germinação de sementes de vegetais superiores, como observado por Oliveira *et al.* (1991), interagindo com fungos micorrízicos arbusculares do solo, influenciando no desenvolvimento de sementes e plântulas de *Genipa americana* nativas destes ecossistemas e modificando a composição química do solo subjacente (Silva, 2007; Vasconcelos, 2007). Por isso, este estudo teve por objetivo avaliar a ação de metabólitos de *Cladonia verticillaris* sobre a germinação e o crescimento inicial de *L. sativa* como contribuição ao conhecimento da dinâmica de ecossistemas onde líquens terrícolas ocorrem e sua influência no funcionamento e estrutura destes ambientes.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Alelopatia

O conhecimento de que as plantas têm a capacidade de interferir no desenvolvimento de outras plantas através de substâncias liberadas para o meio, remonta a antiguidade. Os primeiros registros foram observados por Demócrito 500 a.C e Theophrastus 300 a.C, os quais expuseram que *Cicer arietinum* exauria o solo e inibia a vegetação (Rice, 1984).

Posteriormente, De Candolle em 1832 expôs que o “cansaço das terras” era decorrente do acúmulo de produtos químicos exsudados pelas monoculturas durante anos seguidos, o qual passava a afetar o seu próprio desenvolvimento. Porém, a primeira demonstração científica da alelopatia foi realizada por Schreiner & Sullivan (1909), que provaram que a redução no desenvolvimento de *Vigna unguiculata* era devida a presença de compostos químicos.

O termo alelopatia foi criado por Hans Molisch em 1937 pela união das palavras gregas *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) e segundo ele, “alelopatia é a capacidade das plantas superiores ou inferiores produzirem substâncias químicas que liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento”.

Rice (1984) definiu alelopatia como, “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”. A maioria destas substâncias chamadas aleloquímicos, provém do metabolismo secundário e são liberados para o meio por volatilização, lixiviação, decomposição de resíduos e exsudados que pode interferir o padrão de crescimento e desenvolvimento da vegetação adjacente (Ferreira & Borguetti, 2004). Esses aleloquímicos representam função de proteção (Lovett *et al.*, 1982), pois durante o processo de evolução destas plantas estas substâncias representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento e desenvolvimento das plantas (Waller, 1999).

Em 1996, a sociedade internacional de alelopatia (IAS) ampliou a definição de alelopatia aos processos que envolvem a liberação de metabólitos secundários por plantas, líquens, microrganismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento

de sistemas biológicos. Segundo Gniazdowska & Bogatek (2005), esses compostos podem ser considerados como parte de uma rede de comunicação química entre os organismos.

Na natureza, é difícil distinguir e identificar os efeitos individuais, mecanismos de competição e alelopátia, devido à complexidade biológica dos processos e, por ocorrerem simultaneamente (Durigan & Almeida, 1993; Souza Filho & Alves, 2002; Dakshini *et al.*, 1999). Contudo, a distinção fundamental é que a competição entre plantas reduz ou remove do ambiente um fator de crescimento necessário aos organismos envolvidos, enquanto alelopátia ocorre a adição de um fator ao meio (Alves, 1992).

Whittaker & Feeny (1971) afirmam que os efeitos alelopáticos de uma planta são aceitos, desde que seja comprovado que um inibidor químico efetivo esteja sendo produzido e, ocorra numa concentração potencialmente efetiva no solo e a inibição resultante não seja por luz, água e nutrientes nem por uma atividade animal.

Cabe ressaltar que a liberação de metabólitos secundários traz benefícios à planta que os libera, pois se uma planta pode reduzir o crescimento das plantas vizinhas pela liberação de compostos químicos no solo, isso pode ter como consequência maior chance de acesso à luz, à água e aos nutrientes. Portanto, propicia sua maior adaptação evolutiva (Taiz & Zeiger, 2004). Nesse sentido, a alelopátia confere vantagens às plantas que, ao longo da evolução, desenvolveram um potencial alelopático. Segundo Duke *et al.* (2000), os aleloquímicos são herbicidas naturais que suprimem ou eliminam a competição de espécies vegetais com um potencial agrícola. E, segundo Rice (1986) o estudo desses compostos na estimulação de sementes também é uma importante área de estudo.

Inderjit & Weston (2000) descreveram alguns requisitos para demonstração das interações alelopáticas: 1. Componente ecológico – demonstrando que a interferência ocorre na natureza; 2. Componente químico – identificação, isolamento e caracterização dos aleloquímicos envolvidos; 3. Componente fisiológico – identificação do mecanismo de interferência ao nível bioquímico, fisiológico, celular e molecular.

2.1.1. Natureza e função das substâncias alelopáticas

A co-evolução de plantas, insetos, microrganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários. Já foram reconhecidas como funções ecológicas desses compostos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra raios ultravioleta (UV), a atração de polinizadores e de animais dispersores de sementes (Wink, 1990), bem como sua participação em respostas de alelopatia (Harbone, 1993).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários (anabolismo, com a formação de carboidratos simples, proteínas e lipídios; e catabolismo como a respiração) e o segundo grupo, os metabólitos secundários (Hadacek, 2002). Estes geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em grupos específicos de plantas (Poser & Mentz, 2000).

Durante muito tempo acreditava-se que as substâncias do metabolismo secundário não desempenhavam nenhuma função específica, representando apenas um produto final do metabolismo celular. Entretanto, atualmente reconhece-se que essas substâncias desempenham importante papel na ecologia de plantas e são cruciais para a sua sobrevivência e aptidão (Harbone, 1993), sendo sintetizados de acordo com as leis genéticas (Swain, 1977).

Os aleloquímicos podem ser produzidos em qualquer parte das plantas e são biossintetizados em várias organelas celulares, porém são estocados em várias estruturas secretoras especializadas a fim de evitar a sua autotoxicidade (Gershenzon, 1993). A concentração desses compostos varia de espécie para espécie e, numa mesma espécie, de acordo com a parte da planta e o seu estágio de desenvolvimento (Rodrigues *et al.*, 1993), a sua ação aleloquímica depende mais de sua particular concentração em um dado lugar do que de sua especificidade química (Putnam & Duke, 1978). Fatores relacionados ao estresse abiótico, como temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e presença de microrganismos também podem modificar diretamente a taxa de produção dos aleloquímicos e, conseqüentemente, sua atividade biológica (Einhellig, 1996; Kong *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2004). De fato, tem-se observado aumento no número de estudos visando relacionar as variações ambientais,

respostas químicas das plantas e função ecológica de aleloquímicos de origem vegetal (Kong *et al.*, 2002).

A natureza alelopática de um composto químico pode atuar diretamente na sua fitotoxicidade, liberação, concentração bioativa, persistência e destino no ambiente (Inderjit & Duke, 2003). O conhecimento da natureza química é fundamental para o entendimento das interações alelopáticas. Atualmente, são conhecidos cerca de 10.000 metabólitos secundários com ação alelopática, o que é considerado apenas uma pequena parte da quantidade existente na natureza, pois segundo Durigan & Almeida (1993), o total numérico de substâncias químicas pode atingir a elevada cifra de 400.000. Segundo Larcher (2000), esses compostos podem ser divididos em três grandes grupos: os terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos.

Ao serem lançados no meio, podem promover alterações no solo, sejam em suas propriedades, seja na sua dinâmica de nutrientes ou em sua biota associada (Hadaceck, 2002). A origem de um aleloquímico frequentemente é obscura e sua atividade biológica pode ser reduzida ou aumentada pela ação microbiológica, oxidação e outras transformações (Einhellig, 1996; Waller, 1999; Pires *et al.*, 2001).

A textura e composição do solo têm influência no efeito alelopático, pois segundo Duke (1985) esses mediam a transferência de muitos aleloquímicos, exceto talvez compostos voláteis, de um doador para um receptor. Em solos arenosos, há menor adsorção que nos solos coloidais, e, neste caso, os aleloquímicos liberados seriam mais efetivos, por ficarem livres, na fase aquosa do solo (Inderjit & Dakshini, 1995), uma vez que a inativação e destruição das toxinas é mais lenta em solos pobres (Dionello & Basta, 1984), sendo a retenção favorecida pela matéria orgânica e acidez do solo (Siqueira *et al.*, 1991).

Uma vez introduzidos no ambiente é necessário que se acumulem em quantidades suficientes para afetarem outras plantas, se mantenham por algum tempo, ou seja, liberados continuamente para que os efeitos sejam persistentes (Almeida, 1988).

2.1.2 Mecanismos de ação e funções dos aleloquímicos

Os mecanismos de ação dos aleloquímicos estão relacionados a processos fisiológicos na planta (Horsley, 1977; Rice, 1984). No entanto, os efeitos desses compostos ainda não

estão completamente esclarecidos. Uma das dificuldades é que essas substâncias afetam mais de uma função e provocam efeitos secundários difíceis de distinguir dos principais. O efeito visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária decorrente de alterações moleculares e celulares, cujos mecanismos ainda permanecem obscuros (Ferreira & Áquila, 2000).

A grande diversidade dos compostos que causam alelopatia indica diferentes mecanismos de ação e, em muitos casos, sua fitotoxicidade pode originar-se mais de um rompimento celular generalizado do que de um mecanismo específico (Einhellig, 1995). A ação desses compostos envolve interação entre estresses abióticos e bióticos que pode também só atuar quando em presença de outros (relações sinérgicas), em combinações e proporções específicas que potencializam suas ações (Almeida, 1990; Einhellig, 1999).

Uma vez liberados no meio, os aleloquímicos podem ter ação direta e indireta. A ação direta ocorre quando o composto lixiviado ou volatilizado se liga às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo. Na ação indireta, os aleloquímicos oriundos da decomposição e da exsudação radicular podem causar alterações nas propriedades e nas condições nutricionais do solo, modificações de populações e/ou atividade dos microrganismos (Ferreira & Áquila, 2000). O movimento desses compostos no interior das plantas se dá preferencialmente pela translocação via floema, sendo que a taxa de translocação depende de fatores ambientais (Rice, 1984).

Hadacek (2002) menciona a interferência de aleloquímicos, relacionando à habilidade dessas pequenas moléculas para ligar-se a regiões receptoras de várias proteínas como chaves em fechaduras, possivelmente interferindo em rotas metabólicas. As alterações do aleloquímico podem ser pontuais, mas, como o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo “feedback”, rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos (Ferreira & Borghetti, 2004).

Dentre os estudos das alterações ocasionadas pelos aleloquímicos, podem-se citar: mudanças nas taxas fotossintéticas (Baziramakenga *et al.*, 1994), função dos estômatos (Einhellig & Kuan, 1971), conteúdo de clorofila (Einhellig & Rasmussen, 1979), taxa respiratória (Van sumere *et al.*, 1971; Peñuelas *et al.*, 1996; Carmo *et al.*, 2007), fluxo do carbono (Danks *et al.*, 1975), captação de minerais (Glass, 1973; Harpe & Balke, 1981), permeabilidade da membrana e funções de ATP-ase (Glass & Dunlop, 1974;

Friebe *et al.*, 1997), divisão celular (Muller, 1965; Campanella *et al.*, 2002;); alongamento celular (Jankay & Muller, 1976); estrutura celular (Lorber & Muller, 1976); parede celular (Zobel & Lynch, 1997); síntese de proteínas e ácidos nucléicos (Seigler, 1996; Vyvyan, 2002).

Os efeitos dos aleloquímicos são visíveis na formação, na dinâmica de sucessão e o equilíbrio de comunidades vegetais, influencia a dominância de certas espécies de plantas que interferem na diversidade local, manejo e produtividade de culturas, inibição da fixação de nitrogênio e nitrificação, interferência na dormência de sementes e de gemas, prevenção da decomposição de sementes e influência nas relações com outras plantas, com microrganismos, com insetos e até com animais superiores, incluindo o homem, na atração de polinizadores e estimulantes de germinação de sementes (Mandava, 1985; Durigan & Almeida, 1993; Reigosa *et al.*, 1999; Ferreira & Borguetti, 2004; Taiz & Zeiger, 2004; Nasir *et al.*, 2005). Contudo, de maneira geral, os modos de ação dos aleloquímicos estão envolvidos na inibição e na modificação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Inderjit & Duke, 2003), interferindo também em diversos processos do sistema solo-planta- microrganismos (Siqueira *et al.*, 1991).

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser mensurado em sistemas isolados, porém a questão crítica é se a inibição alcançada no local da planta está em concentração suficiente para influenciar especificamente a reação em estudo, e se outro processo pode ser afetado mais rapidamente. A maior dificuldade de esclarecer esses mecanismos é a separação dos efeitos secundários das causas primárias (Putnam, 1985). Para Souza-Filho & Alves (2002), um dos fatores que dificulta a compreensão nas interações entre efeito e causa dos aleloquímicos é o fato de uma mesma substância afetar diferentes funções fisiológicas da planta, assim como uma mesma função pode ser afetada por mais de um composto.

Os sintomas que se observam na planta atingida são determinados pelo conjunto dos efeitos produzidos pelos aleloquímicos absorvidos pela planta-alvo, tornado-se difícil estabelecer qual deles provoca os sintomas observados (Almeida, 1988; Durigan & Almeida, 1993). A Figura 1 mostra os diferentes processos fisiológicos que podem ser alterado pela ação dos aleloquímicos.

Alguns compostos apresentam o mecanismo de ação bastante similar ao dos herbicidas (Mano, 2006). O entendimento dos efeitos alelopáticos e dos mecanismos de ação de várias

substâncias são importantes para se entender as interações entre plantas, tanto nos ecossistemas naturais, como nos agrícolas (Rodrigues *et al.*, 1993).

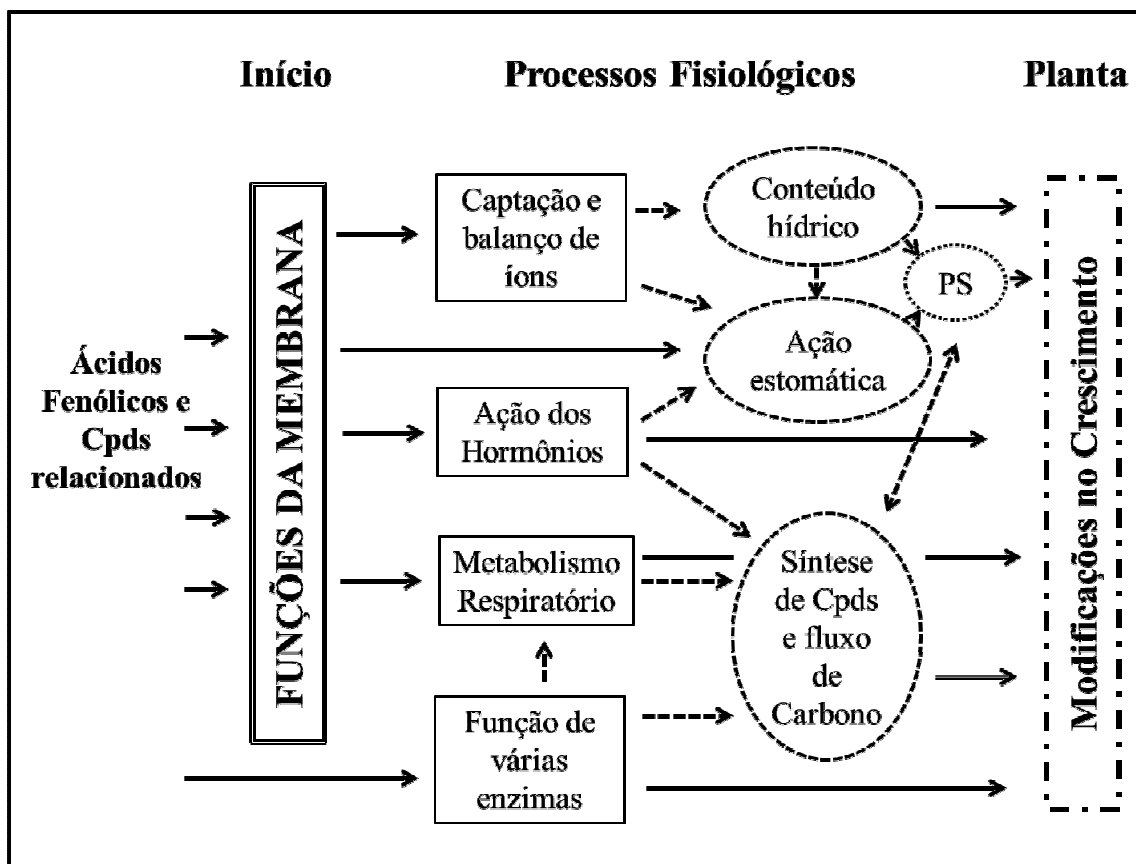


Figura 1. Alteração de processos fisiológicos causados por aleloquímicos sobre a planta alvo. Fonte: adaptado de Einhellig (2004).

2.1.3. Aplicações da alelopatia como bioherbicida

Desde tempos remotos, a aplicação de produtos naturais ou sintéticos é usada como pesticidas na agricultura. O primeiro composto orgânico (2-metil-4, 6-dinitrofenol) destinado ao controle de plantas invasoras foi introduzido em 1932. No entanto, o uso extensivo de herbicidas sintéticos orgânicos iniciou-se efetivamente durante a década de 40 com a descoberta do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (Harrison & Loux, 1995).

Plantas invasoras diminuem o rendimento das culturas em até 50% e, a utilização de herbicidas tem se apresentado como única ferramenta no controle de algumas dessas espécies.

Agricultores em 1998 gastaram US\$ 6 bilhões em herbicidas, quase 70% do total das vendas de agroquímicos (Rogers, 1999). No Brasil, no ano de 2000, da comercialização dos defensivos agrícolas no controle de pragas, doenças e plantas invasoras, cerca de 52% referem-se a gastos com herbicidas, totalizando US\$ 1,30 bilhões (SINDAG, 2002). As vendas de defensivos de Janeiro a Outubro de 2008, comparado ao mesmo período de 2007, apresentaram um crescimento acumulado de 31%, totalizando um mercado de R\$ 10.246 milhões (SINDAG, 2008).

O uso generalizado desses agroquímicos tem resultado em plantas invasoras resistentes, e aumenta a preocupação pública sobre o impacto de herbicidas sintéticos na saúde humana e o ambiente (Macías, 1995; Kropff & Walter, 2000). Esta preocupação tem deslocado atenção para alternativas tecnológicas no controle de plantas invasoras baseado em produtos naturais, com tentativas de reduzir a quantidade de defensivos agrícolas (Putnam, 1983; Dayan *et al.*, 2000). Devido a esses fatores, a identificação e o isolamento de tais substâncias têm se tornado um dos grandes objetivos de muitas companhias agroquímicas (Alves *et al.*, 2002). Na Tabela 1 encontram-se alguns herbicidas desenvolvidos a partir de aleloquímicos.

Tabela 1. Herbicidas desenvolvidos a partir de aleloquímicos naturais

Produtos Naturais	Fontes: plantas ou microrganismos	Herbicida	Fabricante
Anisomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Methoxyphenone	Nihon/Japão
Cineole	Várias plantas	Cinmethylin	Shell/USA
Benzoxazinonas (ác. Hidroxâmico)	Plantas gramíneas	Benzazin	BASF/Alemanha
Iprexil	<i>Iprex pachyon</i>	Benzadox	GULF/USA
Ácido Fusárico	<i>Fusarium sp.</i>	Picloran	Dow/USA
Ácido Quinolínico	<i>Nicotina tabacum</i>	Quincloral	BASF/Alemanha
Moniliformina	<i>Fusarium moniliforme</i>	3,4, dibutoxymoniliformin	CIBA/Geigy/Suíça
Fosfinotricina	<i>Streptomyces viridochromegenes</i>	Glufosinate	Hoechst/Alemanha

Fonte: Hatzios (1987), citado por Alves (1992).

A natureza contém muitos materiais bioativos e compostos com propriedades inexploradas, cujas descobertas dos sítios de ação servem para identificação de novas moléculas herbicidas (Duke *et al.*, 2000). Neste sentido, a alelopatia pode ser considerada uma ciência promissora, especialmente no Brasil, devido à sua ampla biodiversidade (Neves, 2005).

Danks *et al.* (1975) ressaltam que a correta compreensão dos aleloquímicos poderia potencialmente aumentar a produtividade das culturas, protegendo-as de toxinas naturais, e aumentar o rendimento das culturas através da ação de estimulantes naturais.

Alguns estudos têm demonstrado que extratos brutos inibem a germinação e o crescimento de algumas espécies de plantas em condições de laboratório. Estes extratos incluem uma mistura complexa de metabólitos secundários. Entretanto, purificação pelo fracionamento químico leva à diminuição dessa atividade inibitória. Isto é somente possível porque a atividade alelopática pode ser atribuída a um complexo de vários fatores inibitórios e aos efeitos sinérgicos de parte, os quais, separadamente estão abaixo do limiar de toxicidade (Mandava, 1985).

Para Duke *et al.* (2000), estratégias para descobertas de aleloquímicos é o desenvolvimento de análogos aos utilizados nas indústrias farmacêuticas e envolvem *screening* de extratos brutos e compostos purificados para atividade biológica. Estes bioensaios iniciais são rápidos e relevantes para o sistema em questão. Contudo, Vyvyan (2002), relata que simular as concentrações que ocorrem naturalmente em sistemas biológicos e mensurar a quantidade de aleloquímicos liberados e absorvidos pela interação dos compostos em diferentes tipos de solos, e degradação ou modificação dos compostos por microrganismos são algumas das dificuldades dos bioensaios.

Bioensaios têm sido usados para triagem, estimar fitotoxicidade ou promoção de crescimento das plantas, estudar o modo de atuação, bem como avaliar as relações estrutura-atividade de centenas de milhares de compostos (produtos naturais, aleloquímicos, herbicidas sintéticos e naturais e, reguladores de crescimento de plantas - PGRs) (Hoagland & Williams, 2004). Contudo, bioensaios, como as outras técnicas, têm limitações inerentes que devem ser associados à instrumentação técnica (HPLC, GC, espectrometria de massa, RMN, métodos imunológicos, etc) que trazem melhoria no isolamento, separação e

detecção de compostos. Essas técnicas têm proporcionado maior sensibilidade e especificidade das substâncias.

Uma das principais variáveis analisadas nos testes alelopáticos é a germinação. Os testes de germinação são simples de serem realizados. No entanto há uma série de cuidados que devem ser tomados para que se possam ter resultados reproduzíveis. A temperatura, o substrato e a umidade influenciam a germinação e por isso devem ser controlados. Segundo Oliveira *et al.* (2004) o padrão de crescimento é avaliado geralmente de acordo com o comprimento e massa seca da parte aérea e raiz, presença ou ausência de pêlos radiculares, formação e quantidade de raízes laterais, necroses, resposta gravitrópica, entre outros. As substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Portanto, o crescimento das plântulas é muito mais sensível a esses compostos e a sua utilização para determinação do potencial alelopático dos aleloquímicos é muito importante.

Poucas pesquisas têm sido realizadas na busca de produtos naturais como herbicidas e na descoberta de novos herbicidas, devido à estrutura complexa dos compostos que torna a produção muito onerosa. Entretanto, mesmo que o composto estudado seja inadequado comercialmente, a identificação de novos mecanismos de ação pode ser valiosa na produção de herbicidas sintéticos, com natureza química semelhante, porém mais adequado para utilização na agricultura (Duke *et al.*, 2000).

2.2 Líquen

Líquen é a estrutura resultante da associação entre um componente fúngico (micobionte) e uma população de algas ou de cianobactérias (fotobionte). Os fungos liquenizados representam um dos grupos mais bem sucedidos de organismos simbiotes e são freqüentemente estudados como modelo de simbiose (Lawrey, 1995). Cerca de 21% dos fungos são capazes de agir como micobiontes nessas associações e, entre esses, 98% são ascomicetos (Honegger, 1991). Mais de 200 espécies de algas e cianobactérias podem agir como fotobiontes (Cocchietto *et al.*, 2002). Enquanto a maioria dos fungos vive com o micélio de absorção dentro do substrato, os fungos liquenizados constroem um corpo (talo), dentro do qual o fotobionte é cultivado, mostrando uma convergência morfológica e

anatômica entre os líquens e as plantas (Sanders, 2001). Esses “mini-ecossistemas” (Tehler, 1996) são auto-suficientes e ecologicamente tratados como indivíduos, mas num sentido diferente do habitual (Fahselt, 1996). Taxonomicamente, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os líquens são tratados dentro do Reino Fungi, e o nome do líquen refere-se apenas ao fungo (Greuter *et al.*, 2003). É um grupo polifilético e inclui aproximadamente 18.000 espécies e aproximadamente 12 espécies novas são descritas a cada ano (Cocchietto *et al.*, 2002).

Segundo Smith (1955) e Schultz (1991), do ponto de vista morfofisiológico, os líquens podem sobreviver em ambientes nos quais um dos dois indivíduos isoladamente não conseguiria se desenvolver. Esta associação é capaz em alguns lugares inóspitos do ambiente terrestre, apresentando ampla distribuição. Segundo Larson (1987) cerca de 8% de todo território terrestre é dominado por líquens. O micobionte absorve e conserva a água necessária e repassa para o fotobionte os elementos minerais que procedem do pó atmosférico e da água da chuva, além de proporcionar ambiente físico adequado para o organismo fotossintetizante. A alga, a parte produtora de energia, transfere carboidratos e produtos nitrogenados para o micobionte. Dessa forma, uma relação de natureza simbiótica, na qual os organismos são beneficiados (Raven *et al.*, 2001; Cocchietto *et al.*, 2002). Além disso, o crescimento lento do talo desses organismos protege-os do ataque de microrganismos e herbívoros.

2.2.1 Substâncias liquênicas: importância econômica e ecológica

O primeiro estudo avaliando substâncias liquênicas data da origem da Química Orgânica (Gmelin 1858). Asahina & Shibata (1954) citam que as primeiras investigações científicas dessas substâncias foram conduzidas por Zopf & Hesse por volta de 1907. Muitos dos papéis biológicos destes compostos iniciaram após 1940, quando a natureza antibiótica daqueles foi reorganizada e foram estendidos até aos clínicos (Vartia, 1973). Com o desenvolvimento das técnicas de cromatografia, na década de 60 um grande número de substâncias liquênicas foi identificado (Cocchietto *et al.*, 2002). Particularmente importante foi a publicação de Culberson (1969). Uma das substâncias mais amplamente estudada é o ácido úsnico. Esta foi isolada pela primeira vez em 1844 e tornou-se não somente um dos metabólitos de líquens mais conhecido como um dos poucos disponíveis comercialmente (Ingólfssdóttir, 2002). Esse composto é unicamente encontrado nos líquens.

Os fungos liquenizados são produtores de uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, conhecidas como produtos extracelulares ou metabólitos secundários que se encontram na medula ou no córtex (Fig. 2), raramente em ambas as camadas, em concentrações de 0,1 a 10%, em relação ao peso seco do talo, embora em alguns casos a concentração possa atingir até 20% (Fahselt, 1996; Honda & Vilegas, 1998). Estes são quase que na sua totalidade de natureza fenólica (Hale, 1983). Cerca de 800 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens são conhecidos, sendo a maior parte dessas substâncias sintetizadas exclusivamente por esses organismos: ácidos alifáticos, meta e para-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido púlvínico (Piervittori *et al.*, 1994; Elix & Waralaw, 1996; Huneck & Yoshimura, 1996; Huneck, 2001). Segundo Culberson (1977) as muitas características de produtos liquênicos são compostos aromáticos que são formados pela unidade fenólica simples pela via do acetil-polimalonato, com ácidos alifáticos e ésteres. Numerosos terpenóides e esteróides são formados pela via do ácido mevalônico e alguns derivados do ácido púlvínico pela via do ácido chiquímico (Fig. 3).

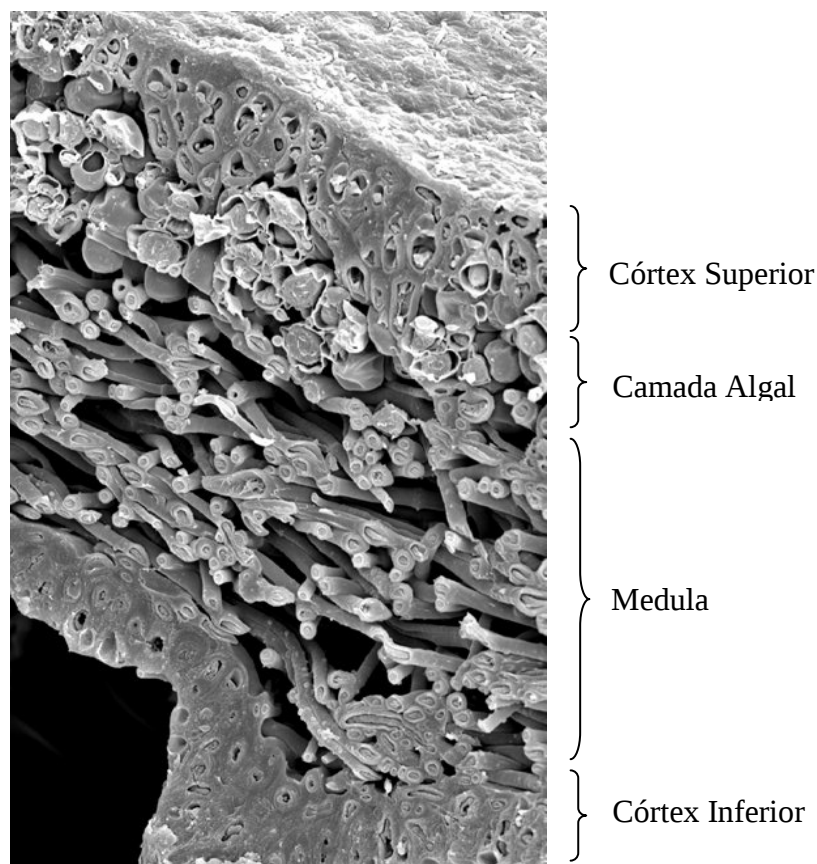


Figura 2. Corte transversal de *Canomaculina pilosa* (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (Fonte: Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica - UFPR). Aumento de 1000 x.

Algumas teorias tentam explicar a razão pela qual certas espécies produzem mais produtos secundários que outras. Uma das possibilidades descritas é que aqueles que produzem altos níveis de compostos são capazes de crescer de forma mais severa nos ambientes, como aqueles com captação de nutrientes limitada ou aqueles com alto conteúdo de nitrogênio e fósforo (Fahselt, 1996).

Os distintos compostos fenólicos produzidos pelos líquens têm atraído atenção de pesquisadores. Suas informações sobre estrutura, origem biogenética e significado filogenético têm aumentado de forma constante (Lawrey, 1995). O derivado dos compostos liquênicos é mais bem documentado que em qualquer outro grupo filogenético, entretanto a bioatividade associada a estes compostos tem sido geralmente ignorada (Romagni *et al.*, 2004).

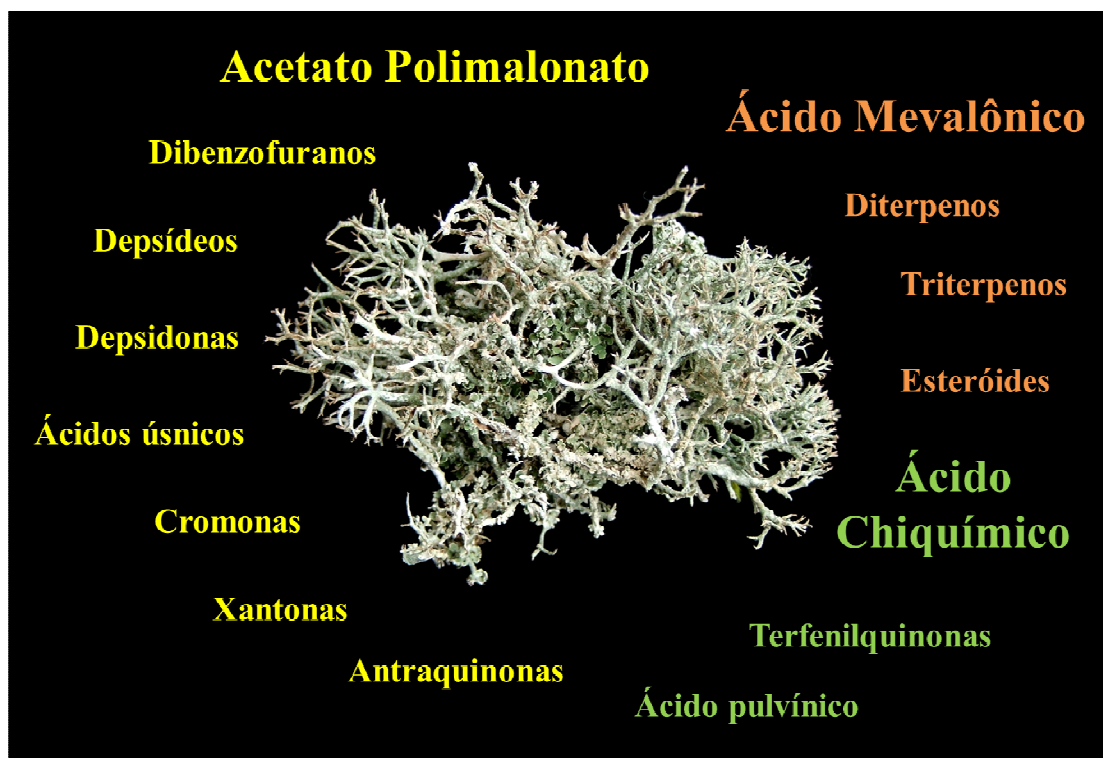


Figura 3. Classes de compostos liquênicos organizados de acordo com sua origem Biossintética. Fonte: Adaptado de Dayan & Romagni (2001).

Alguns fungos liquenizados são particularmente sensíveis a compostos tóxicos, sendo utilizados como indicadores de componentes tóxicos do ar poluído, particularmente do dióxido de enxofre; no mapeamento de metais pesados e outros poluentes freqüentemente

encontrados ao redor de pólos industriais; e ainda utilizados como instrumentos para monitorar a contaminação por substâncias radioativas (Hawksworth, 1984; Purvis, 2000).

Devido às suas cores, que variam do branco ao negro, passando por tonalidades de vermelho, laranja, marrom, amarelo e verde, muitos fungos liquenizados são utilizados como fonte de corantes. Muitas espécies também têm sido utilizadas como medicamentos e bases para fixadores na indústria de perfumes, cosméticos, formulação de cremes, pastas de dente, desinfetantes bucais, desodorantes e protetores solares (Raven, 2001; Purvis, 2000; Ingólfssdóttir, 2002), além de outras espécies serem comestíveis.

Grande número destes compostos apresenta ação antimicrobiana (Xavier Filho *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1993; Esimone & Adikwu, 1999; Falcão *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002), antifúngica (Yamamoto *et al.*, 1993), antiinflamatória (Higuchi *et al.*, 1993; Vijayakumar *et al.*, 2000, Maia *et al.*, 2002); antitumoral-mutagênica, antiviral e imunomoduladora (Takai *et al.*, 1979; Hirayama *et al.*, 1980; Shibamoto & Wei, 1984; Hirabayashi *et al.*, 1989; Carneiro-Leão *et al.*, 1997; Stuelp-Campelo *et al.*, 2002; Kristmundsdóttir *et al.*, 2002), inibidora do vírus de imunodeficiência humana (VIH) (Nakanishi *et al.*, 1998; Neamati *et al.*, 1997; Hirabayashi *et al.*, 1989), inibidora enzimática (Umezawa *et al.*, 1983; García *et al.*, 1980; Shibuya *et al.*, 1983; Higuchi *et al.*, 1992), alelopática (Marante *et al.*, 2003; Romagni *et al.*, 2004) e atividade analgésica e antipirética comparável aos fármacos conhecidos (Hüneck, 1978), mostrando potencial valor econômico. Muitas destas substâncias derivadas dos fungos liquenizados podem ser obtidas de culturas axênicas de micobiontes (Hamada & Miyagawa, 1995; Hamada *et al.*, 1996), ou imobilização celular e enzimática (Pereira, 1998; Pereira *et al.*, 2002). Esses compostos também têm sido utilizados para taxonomia do grupo usando testes microquímicos.

Os líquens podem ser envolvidos em vários processos, especialmente biogeoquímicos mediados por microrganismos. Para Lawrey (1995), os líquens podem ter papel proeminente na regulação da colonização de plantas vasculares e na sucessão de comunidades em ecossistemas onde eles dominam a flora, tendo suas substâncias como um atributo importante na estratégia ecológica.

2.2.2. Potencial alelopático dos fungos liquenizados

A presença de substâncias liquênicas no solo e, sua estabilidade com o tempo, possibilita a ocorrência de fenômenos alelopáticos (Legaz *et al.*, 1986), podendo através dos compostos orgânicos afetar o crescimento e reprodução dos microrganismos do solo, ou mesmo inibir a germinação de sementes localizadas no perfil daquele (Hess, 1960; Whiton & Lawrey, 1982; 1984; Ingolfssdottir *et al.*, 1985; Nishitoba *et al.*, 1987; Fahselt, 1994; Giordano *et al.*, 1999; Marante *et al.*, 2003; Romagni *et al.*, 2004). Por meio dessas substâncias, os líquens travam batalhas químicas em suas fronteiras, defendendo ativamente suas áreas de ocupação. Estudos antivirais e antibióticos contribuem para o conhecimento alelopático dessas espécies.

Os metabólitos secundários produzidos por líquens podem exibir uma enorme variedade de efeitos aleloquímicos e o seu papel defensivo tem sido estabelecido por numerosos investigadores (Rundel 1978; Lawrey 1987) dos quais muitos são utilizados para dissuadir alimentação de herbívoros generalistas (Slansky 1979; Lawrey 1995; Nash 1996; Romagni *et al.* 2004; Gauslla 2005; Pöykkö *et al.* 2005).

Alguns estudos têm estabelecido que extratos aquosos de vários líquens possuem efeitos alelopáticos sobre plantas vasculares (Burzlaff, 1950; Follmann, 1966; Pyatt, 1967 Huneck & Schreiber, 1972; Reddy 1978). Cowles (1982) estabeleceu que exsudatos de *Cladonia stellaris* inibiam completamente o crescimento de *Spruce Black* (conífera). Balke (1985) relatou que os compostos liquênicos também podem diminuir a captação de nutrientes de plantas vasculares. Esse autor observou que *Cladonia rangiferina* L. e *Cladonia alpestris* L. diminuíram a concentração de PO_4^{3-} em *Pinus banksiana* Lamb. e *Picea glauca* Moench., e que *C. rangiferina* diminuiu a captação de N em *Jack pine*, mas nenhuma das duas *Cladonias* alteraram a concentração de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Efeitos alelopáticos de *Cladonia* também podem inibir o estabelecimento da regeneração (Fisher, 1979). Investigações têm demonstrado que extratos aquosos de vários líquens são capazes de inibir a germinação de sementes e o crescimento de plantas vasculares (Rondon 1966; Vainstein & Tolpysheva, 1975; Follmann & Nakagawa, 1963; Oswiecimska *et al.*, 1979; Sedia & Ehrenfeld 2003; Han *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2008). *Letharia vulpinica* inibe a germinação de grãos de trigo quando submetidos a extratos com tampão fosfato (Dauriac & Rondon, 1976). Existem relatos também de substâncias liquênicas estimulando o desenvolvimento de sementes (Ibi *et al.*, 1979; Quilhot *et al.*, 1981;

Yano, 1994). O ácido tetrônico e seus derivados de *Sticta coronata* apresentaram efeito estimulador no crescimento de raízes de arroz, enquanto que as mesmas substâncias quando subtraídas do seu grupo carbometoxi, demonstraram efeito inibidor (Ibi, *et al.*, 1979).

Alguns pesquisadores tem procurado elucidar os papéis alelopáticos e os modos de ação específicos de alguns compostos liquênicos. Este grupo descobriu que o (-) ácido úsnico pode inibir a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, uma enzima-chave na biossíntese dos carotenóides e, que análogos da emodina podem causar branqueamento de gramíneas. Continuidade à investigação sugeriu uma diminuição na atividade do fotossistema II (PSII), mas o modo putativo de ação para estes compostos ainda não foi determinado. Outro grupo de análogos da antraquinona inibe a germinação de sementes e a formação de raiz primária (Romagni *et al.*, 2004). Segundo esses autores, estes dados preliminares sugerem que cada substância liquênica possui vários papéis ecológicos. Essas podem inibir trajetórias cruciais para o desenvolvimento das plântulas, podendo diminuir a competição interespecífica. A atividade *in vitro* do ácido úsnico é superior em determinados sítios de ação quando comparado a outros inibidores sintéticos como herbicidas. E, segundo Romagni (2000), esse composto possui estrutura similar a classe de herbicidas das triquetonas que são inibidores da p-hidroxifenilpiruvatodioxigenase (HPPD). Proska *et al.* (1996) relataram que o (-) ácido úsnico inibe a atividade da urease e arginase. Lasceve & Gaugain (1990) têm documentado efeitos fitotóxicos do ácido úsnico, incluindo inibição dos processos de transpiração e oxigênio envolvidos em plântulas de milho e girassol. Vavas seur *et al.* (1991) explicam que esse mesmo composto em concentrações pequenas inibe a respiração, pela interferência nos primeiros passos da fosforilação oxidativa e na via alternativa da oxidase, apresentando, portanto uma forte influência em todos os processos respiratórios no mesófilo de *Commelina communis*. Estudos semelhantes sobre a fitotoxicidade desse composto também foram realizados por Romagni *et al.* (2000) e, Cardarelli *et al.* (1997) descreveram os efeitos antimitóticos do ácido úsnico sobre culturas de células vegetais. Substâncias liquênicas também têm sido observadas com efeitos tóxicos diretos em plantas superiores (Romagni *et al.*, 2000; Lechowski *et al.*, 2006).

Os depsídeos (ácidos barbático e lecanórino) e o tridepsídeo (ácido girofórico) inibem o transporte de elétrons fotossintéticos em cloroplastos isolados (Ellis *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2000).

Folman & Peters (1966) relatam que os ácidos lecanórico, úsnico e girofórico são capazes de inibir o crescimento e a produção de biomassa de *Helianthus*, *Pinus*, *Pseudotsuga* e *Zea*. Extratos de *Evernia prunastri* provocaram alterações significativas no peso fresco, teor de clorofila e na reação de Hill em *Citrullus vulgaris* (Yague & Estéves, 1988).

As substâncias liquênicas são consideradas extremamente resistentes à decomposição por microrganismos. Dessa forma, permanece por longos períodos no solo (Malicki, 1965; Dawson *et al.*, 1984), inibindo significativamente a atividade microbiana e o crescimento de fungos micorrízicos (Brow & Mikola, 1974; Cowles, 1982; Goldner, 1986; Fisher, 1979, Lawrey, 1995; Hyvärinen *et al.*, 2002; Sedia & Ehrenfeld, 2005). Portanto, efeitos inibitórios de compostos liquênicos em plantas vasculares possui maior toxicidade com distúrbios indiretos em associações micorrízicas do que toxicidade direta (Rundel, 1978; Lawrey, 1995).

Barkman (1958) descreveu a mortalidade de líquens causados por exudatos químicos de líquens vizinhos. Pyatt (1973) e Whiton (1984) realizaram as primeiras tentativas do potencial alelopático de compostos liquênicos na interação líquen-líquén, usando germinação de ascósporo como indicador. Estudos demonstram que os ácidos pulvínico e evérnico inibem completamente a germinação de esporos de *Graphis scripta* e *Caloplaca citrina*. Esses resultados mostraram que estas substâncias são perigosas para líquens crostosos que não possuem métodos alternativos de propagação (Lawrey, 1995). Dessa forma, uma espécie pode ser substituída por outra pela inibição química, desempenhando papel no estabelecimento das populações liquênicas.

Lawrey (1977) relatou os primeiros estudos de líquens sobre briófitas, utilizando substâncias puras e extratos acetônicos de várias espécies de *Cladonia* para três espécies de musgos. Esse autor observou inibição completa da germinação e crescimento dos esporos dos musgos e, que a toxicidade dependia da concentração e do pH. Gardner & Muller (1981) observaram que o pH do ácido fumarprotocetrárico influenciava na germinação dos esporos de *Funaria hygrometrica*, os quais relatavam que 97% germinavam quando submetidos ao pH 6, 7 e 8 e, 41% em pH 5. Frahm *et al.* (2000), demonstraram que os extratos de duas espécies de líquens crostosos, *Cryptotheca sp.* e *Pertusaria sp.*, inibiam a germinação dos esporos das briófitas *Ceratodon purpureus* (Ditrichaceae) e *Funaria hygrometrica* (Funariaceae).

Há vários compostos liquênicos eficazes contra insetos, particularmente moscas brancas (*Bemisia tabaci*). Como exemplo pode-se citar os ácidos (-)-úsico e vulpínico que causaram mortalidades significativas em estudos realizados por Romagni *et al.* (2004).

Apesar desses e das importantes implicações em ecossistemas terrestres, poucos são os estudos realizados sobre as interações alelopáticas de líquens, o que vem reforçar a importância de estudos nessa área que possa conduzir ao isolamento de substâncias com inúmeras potencialidades na medicina e agricultura. A Tabela 2 relaciona alguns compostos liquênicos que possuem bioatividades bem estabelecidas.

Tabela 2. Potencialidades pesticidas de metabólitos liquênicos. Fonte: Dayan & Romagni (2001)

COMPOSTO	CLASSE QUÍMICA	POTENCIALIDADES
(-)-16 α -hidroxicaurano	Diterpeno	Citotóxico
(+) w (-) ácido isoúsico	Dibenzofurano	Antimicrobiana Fungicida
(+) e (-) Ácido úsico	Dibenzofurano	Antimicrobiano Fungicida Herbicida
Atranorina	<i>para</i> -depsideo	Fungitóxica
Ácido Barbático	<i>para</i> -depsideo	Inibidor do PSII
Ácido Didímico	Dibenzofurano	Antimicrobiano
Entotheino	Dibenzopiranono	Bactericida
Fallacinal	Antraquinona	Antimicrobiana
Ácido Girofórico	<i>para</i> -depsideo	Inibidor do PSII
Ácido Haemathamnolico	<i>meta</i> -depside	Inibidor do PSII
Ácido Hiascico	<i>para</i> -depside	Fungitóxico
Ácido Leprapínico	Ácido Pulvínico	Antibacteriano
Ácido Lecanórico	<i>para</i> -depside	Fungitóxico Inibidor do PSII
Ácido Pinástrico	Ácido pulvínico	Antiherbivoria
Ácido Tiofanico	Xantonas	Fungicida
Ácido Tiofanico	Xantonas	Fungicida
Ácido Ursólico	Triterpeno	Citotóxico
Ácido Vulpínico	Ácido Pulvínico	Antiherbivoria
Zeorina	Triterpeno	Antimicobacteriano

2.2.3. *Cladonia verticillaris*

Espécie da família Cladoniaceae, a mais representativa deste táxon, é comumente encontrada em tabuleiros arenosos costeiros e de interior do nordeste do Brasil, com fitofisionomia de cerrado (Fig. 4). A família Cladoniaceae pertence à ordem Lecanorales, e é posicionada dentro da classe dos Ascomycetes. Nesta ordem é típico o asco bitunicado e deiscente, maior argumento para abrigar um grupo bastante heterogêneo, além de dados moleculares de subunidades do DNA ribossômico, que afirmam sua origem monofilética. Além destes caracteres, possuem como fotobionte algas verdes unicelulares. É caracterizada por um talo crostoso ou esquamuloso, a partir do qual porções semelhantes a hastes suportam o ascostroma, também denominadas de podécios, que é parte dominante do talo (Nash, 1996). Quanto à adaptação ecológica, as populações de Cladoniaceae estão geralmente confinadas, e têm períodos distintos de erupção ou contração, que dependem dos ciclos de sucessão.



Figura 4. *Cladonia verticillaris* em seu habitat.

Líquens do gênero *Cladonia*, embora não possuam uma associação com o substrato tão íntima quanto os líquens crostosos, contribuem para a formação de húmus através da desintegração de fragmentos do talo (Asta *et al.*, 2001). Estudos revelam que componentes biologicamente ativos de extratos aquosos de 15 espécies do gênero *Cladonia* inibiram o crescimento de *Allium cepa* (Oswiecimska *et al.*, 1979). Segundo Hammer (2003) a

Australasia¹ é um centro de endemismo do gênero *Cladonia*, sendo a diversidade claramente notável na Nova Zelândia, que possuía cerca de 60 espécies reconhecidas até 2003, ano em que oito novas espécies foram descobertas e mais oito estão em discussão.

O líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., denominado cladoniforme, foi classificado em 1894 por Vainio. Pertence à divisão dos Discomycetes, classe dos Ascomycetes, ordem Lecanorales e família Cladoniaceae (Ahti, 1993). *C. verticillaris* caracteriza-se por possuir verticilos ao longo de seu talo. Espécie de hábito terrícola possui talo esquamuloso no princípio de sua formação, tomando aspecto fruticoso, a partir do qual porções semelhantes a hastes suportam o ascostroma, também denominadas de podécios (pouco ramificado), que é parte dominante do talo (Nash, 1996). Possui talo primário evanescente, com cifos sobrepostos, curtos e amplos, poros nas articulações com o cifo superior. Tem, usualmente, 7cm a 12cm de altura (Pereira, 1998). Base plana, rizinas pálidas a pretas, sem conídios, discos himeniais não comuns, marrom, sem ascósporos (Ahti & Marcelli, 1995). Quando submetido a pouca umidade apresenta cor branco-acizentada e aspecto amarronzado, quando exposta diretamente a luz solar; em período chuvoso seu talo torna-se mesclado de verde e branco.

É considerada uma espécie endêmica da costa brasileira encontrada do Rio Grande do Sul à Paraíba (Ahti *et al.*, 1993; Fleig *et al.*, 1995), mas seu registro já foi realizado para cerrados não litorâneos, visto ser extremamente influenciada pelos fatores microclimáticos locais (Legaz *et al.*, 1986), bem como regulada pelos climas sazonais, liberando quantidades diferenciadas de suas substâncias para o solo (Pereira, 1989). Pode formar extensas colônias na areia, na restinga de florestas e da população em baixas altitudes, até 1200 m (Ahti & Marcelli, 1995).

Asahina (1943), Culberson (1969) e Garcia-Junceda & Xavier-Filho (1986) relatam apenas a presença do ácido fumarprotocetrárico (FUM) no talo de *C. verticillaris*. Xavier-Filho *et al.* (1984) fazem referência a essa substância como componente dessa espécie, mas também reportaram a presença do β -metilorcinol carboxilato, atranorina (ATR) e ácido evérnico. Porém Huovinen *et al.* (1990) refutaram esse resultado argumentando que essas substâncias poderiam ser produtos da degradação do material talino, causado pela longa maceração em metanol. Vicente e Xavier-Filho (1979), Huovinen *et al.* (1990) e

¹ Nome da época em que o vocábulo *Oceania* ainda não era usado e incluíam-se a Austrália, a Tasmânia e a Nova Zelândia como partes austrais da Ásia.

Ahti *et al.* (1993) observaram além do FUM, a constância do ácido protocetrárico (PRO) e ácido fumarprotocetrárico (substância Cph₂). Em anos posteriores, Ahti *et al.* (1993) e Pereira (1998) relataram que essa espécie produz o FUM como composto principal, o PRO e ATR como substâncias acessórias. Ahti & Marcelli (1995) detectaram a presença do FUM e traços de PRO e ácido fumarprotocetrárico. A presença ou não das substâncias mencionadas depende da sazonalidade e método de extração, porém como observado o composto majoritário FUM sempre se encontra presente nessa espécie, podendo variar apenas em concentração.

Quanto à produção em função da época do ano foi verificado que em exemplares de *C. verticillaris* ocorrentes em tabuleiros arenosos da Paraíba havia maior produtividade de compostos ativos durante o período seco do ano (verão). Nessa região foram detectados maiores teores de atranorina e ácido fumarprotocetrárico, princípios ativos de natureza fenólica, assim como a liquenina, polissacarídeo liquênico também ativo contra tumores sólidos experimentais testados *in vivo* (Santos, 1996; Santos *et al.*, 1997).

Segundo Ahti & Marcelli (1995) essa espécie é uma das mais espetaculares do gênero *Cladonia* e dos líquens em geral, devido à sua variabilidade taxonômica, formando o complexo *C. verticillaris*.

2.2.3.1 Ácido fumarprotocetrárico

As unidades estruturais fenólicas podem ciclizar-se pela condensação aldol intramolecular levando a formação de compostos do tipo ácido orselínico, que formará a partir da ciclização os depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos (Yano, 1994). Diferenças estruturais entre depsídeos e depsidonas não ocorrem necessariamente após a ciclização. Por exemplo, o ácido fumarprotocetrárico (FUM) (Fig. 5a) pode ser originado por inserção do ácido fumárico na posição 3 do ácido orselínico (na forma de ácido 3-metil-orselínico) dando origem ao anel B do FUM (Fig. 6), ou por esterificação direta do grupo -CH₂OH do anel B do ácido protocetrárico (PRO) (Fig. 5b e Fig. 7) com o ácido fumárico (Vicente & Legaz, 1988; Honda & Vilegas, 1998). O FUM surge então de uma reação de condensação oxidativa. Dessa forma, o FUM possui estrutura similar ao PRO. Ambas as substâncias são depsidonas formadas por duas unidades aromáticas substituídas. Seus cristais são também semelhantes,

em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão em torno de 250°C (Asahina & Shibata, 1954). Ambos os compostos são derivados do β -orcinol e biossintetizados pela via do acetato polimalonato, entretanto o FUM é derivado da atranorina (ATR) (Fig. 8) e em etapas subseqüentes, produz-se o ácido hipoprotocetrário (HIPO) (Fig. 9) e seu aldeído, onde a partir deles, há a biossíntese do PRO (Pereira *et al.*, 1999). O FUM é classificado como um aldeído derivado de depsidona (Huneck, 1973) que está presente na medula do talo líquênico (Garcia-Junceda & Xavier-Filho, 1986; Huovinen *et al.*, 1990).

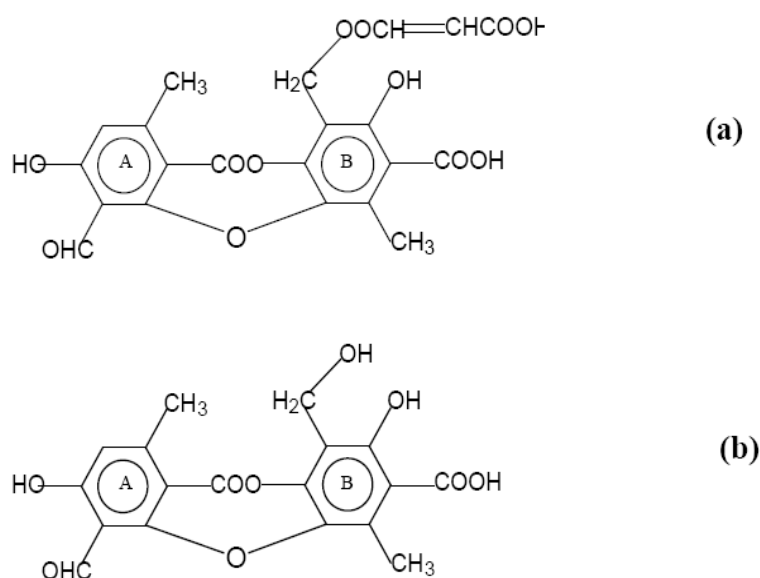


Figura 5. Modelo estrutural do ácido fumarprotocetrário (a) e protocetrário (b)

O FUM possui uma série de bioatividades tanto ecológica, quanto econômica. Segundo Schatz (1963), Syers (1969) e Vasconcelos (2007), esse composto possui ação pedogenética, podendo reagir com partículas de granito e mica, podendo ser imprescindível à formação do solo e sucessão ecológica. Após períodos chuvosos, o FUM pode ser lixiviado ao solo e ter função alelopática (Xavier-Filho *et al.*, 1985; Silva, 2007). Possui atividade antiherbivoria (Reumatimann & Scheidegger, 1987) e contribui na regulação da atividade enzimática de urease (Vicente e Xavier-Filho, 1979). Pode ser usado no combate a resfriados, bronquites, asma, anorexia e desordens gástricas (Huovinen *et al.*, 1983).

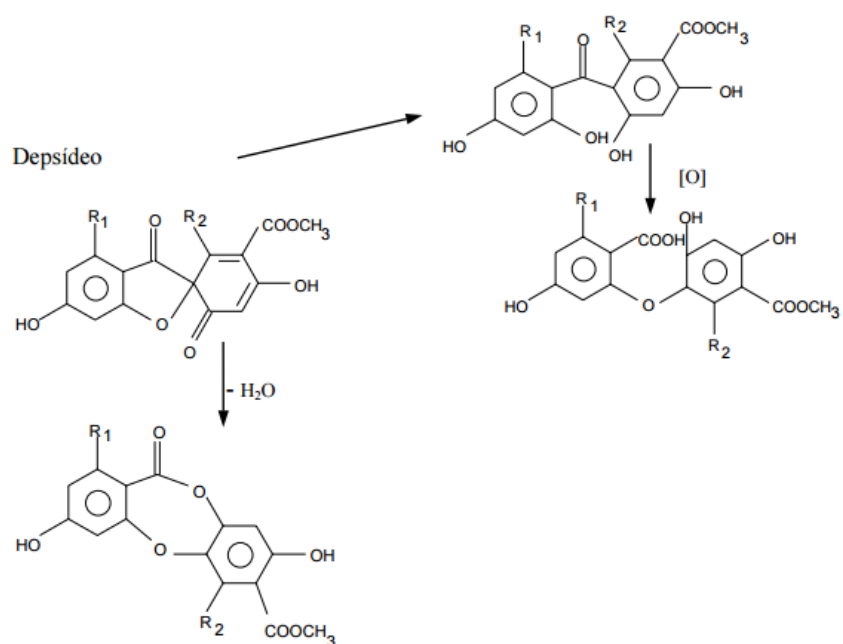


Figura 6. Reação entre 3-metil ácido orselínico e ácido fumárico para obtenção do ácido fumarprotocetrárico. Fonte: Honda, 1997.

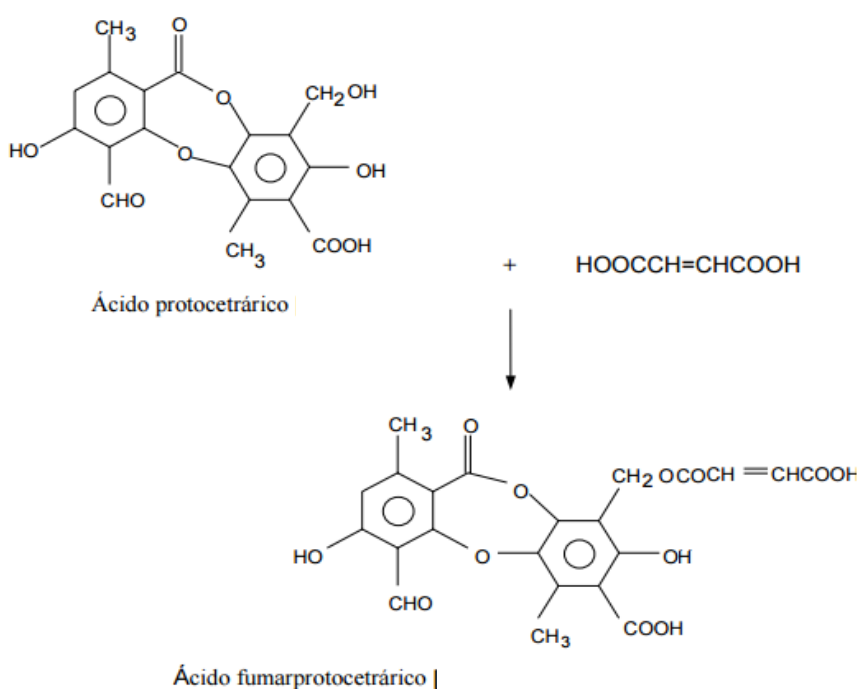


Figura 7. Reação de formação do ácido fumarprotocetrárico por esterificação do grupo CH₂OH da posição 3' do ácido protocetrárico com ácido fumárico. Fonte: Honda, 1997.

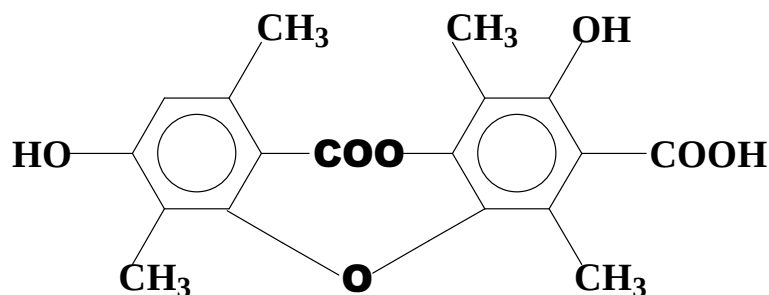


Figura 8. Modelo estrutural do ácido hipoprotocetrárico

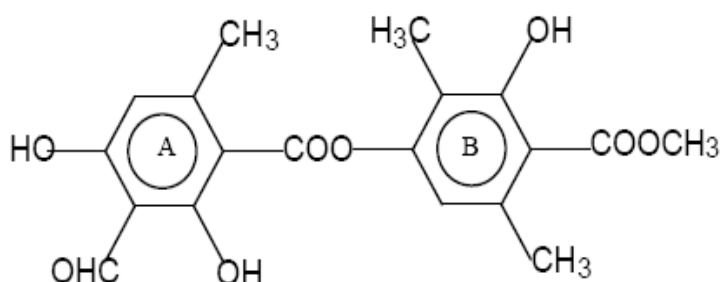


Figura 9. Modelo estrutural da atranorina

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahti, T. 1993. Cladoniaceae. In: W. Greuter [ed.], Names in current use in the families Trichocomaceae, Cladoniaceae, Pinaceae, and Lemnaceae. **Regnum Vegetabile** 128: 58–106.
- Ahti, T.; Marcelli, M.P. 1995. Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. **Bibliotheca Lichenologica** 58:5-26.
- Almeida, F.S. 1988. Alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, **Circular** 53, 68 p.
- Almeida, A.R.P. 1990. A defesa das plantas. **Ciências Hoje** 11 (62): 38-45.
- Alves, P.L.C.A. 1992. Estudo das propriedades alelopáticas de espécies de *Eucalyptus* spp. e sua potencialidade no manejo de plantas daninhas. **Relatório FINEP**. Jaboticabal: FCAV.
- Alves, S.M.; Arruda, M.S.P.; Souza Filho, A.P.S. 2002. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. Pp.79-102. In: Souza Filho, A.P. & Alves, S.M. **Alelopatia: Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental.

- Asahina, Y. 1943. Chemsmsus der Claonien unter besonderer Berucksichtigung der japanischen Arten (Fortsetzung). **Journal of Japanese Botany** **49**: 227-244.
- Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokyo. Japanese Society Promotion of Science.
- Asta, J.; Orry, F.; Toutan, F.; Souchier, B.; Villemin, G. 2001. Micromorphological and ultrastructural investigations of the lichen-soil interface. **Soil Biology & Biochemistry** **33**: 323-337.
- Balke, N.E. 1985. Effects of allelochemicals on mineral uptake and associated physiological processes. **ACS Symposium Series** **268**: 161-178.
- Barkmann, J.J. 1958. **On the ecology of cryptogamic epiphytes**. PhD thesis, University Leiden.
- Baziramakenga, R.; Simard, R. R.; Leroux, G. D. 1994. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorohyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology** **20** (11): 2821-2833.
- Brown, R. T.; P. Mikola. 1974. The influence of fruticose soil lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees. **Acta Forestalia Fennica** **141**: 1-22.
- Burzlaff, D.F. 1950. The effect of extracts from the lichen *Parmelia nolliuscula* upon seed germination and upon the growth rate of fungi. **Journal The Colorado-Wyoming Academy of Science** **4**: 56.
- Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; De Cicco Nardone, F., Alesiani, O.; Rossiello, F. 1997. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences** **53** (8): 667-672.
- Carneiro-Leão, A.M.A.; Freitas Buchi, D.; Iacomini, M.; Gorin, P.A.J.; Oliveira, M.B.M. 1997. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal of submicroscopic cytology and pathology** **29**: 503-509.
- Campanella, L.; Delfini, M.; Ercole, P.; Iacoangeli, A.; Risuleo, G. 2002. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie** **84** (4): 329-334.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L.; Takaki, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica** **21** (3): 697-705.
- Campos, J.M.S.; Davide, L.C.; Soares, G. L. G.; Viccini L.F. 2008. Mitodepressive and clastogenic effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology** **31** (1): 141-145.
- Culberson, C.F. 1969. **Chemical and botanical guide to lichen products**. University of North Carolina Press, Chapel Hill. N. C.

- Danks, M.L.J.S.; Fletcher, N.D.E.L.; Rice. 1975. Influence of ferulic acid on mineral depletion and uptake of ^{86}Rb by Paul's Scarlet Rose cell-suspension. **American Journal of Botany** **62**: 749-755.
- Dauriac, H.; Rondon, Y. 1976. Quelques aspects des propriétés d'un lichen, ie *Letharia vuipina*, em biologie végétale expérimentale. I. Action sur la germination Du bié et Le development de l'all. **Bulletin de la Société botanique de France** **123**: 235-241.
- Carvalho, S.I.C. 1993. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 72 p.
- Chou, C.H. 1986. The role of allelopathy in subtropical agrosystems in Taiwan. Pp. 57-73. In: Putnam, A.R.; Tang, C.S. **The Science of Allelopathy**. Toronto: John Wiley & Sons.
- Chou, C.H. 1999. Methodologies for allelopathic research: from fields to laboratory. Pp.3-24 In: Macias, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G. & Cutler, H.G. (Eds.) **Recent advances in allelopathy**. Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz.
- Cocchietto, M.; Skert, N.; Nimis, P.L.; Sava, G. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften** **89** (4): 137-146.
- Cowles, S. 1982. Preliminary results investigating the effect of lichen ground cover on the growth of black spruce. **The Canadian Field-Naturalist** **109**: 573-581.
- Culberson, C.F. 1969. **Chemical and botanical guide to lichen products**. University of North Carolina Press, Chapel Hill. N.C.
- Culberson, C.F. 1977. **Second supplement to "Chemical and Botanical guide to lichen products"**. St. Louis: American Bryological and Lichenological Society, Missouri Botanic Garden.
- Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L.; Inderjit. 1999. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. Pp. 3-14. In: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press.
- Dayan F.E., Romagni J.G., Duke S.O. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology** **26**: 2079-2094.
- Dayan, F.E., Romagni, J. 2001. Lichens as a potential source of pesticides. **Pesticide Outlook** **12**: 229-232.
- Dawson, H.J., Hrutfiord, B.F., Ugolini, F.C. 1984. Mobility of lichen compounds from *Cladonia mitis* in arctic soils. **Soil Science** **138**: 40-45.
- Dionello-Basta, S.B.; Basta, F. 1984. Inibidores de germinação e de crescimento em plantas usadas na medicina popular. **Ciência e Cultura** **36**: 1602-1606.
- De Candolle, M.A.P., 1832. **Physiologie Vegetale**. Pp. 1474-475. Tome III. Paris: Bechet Jeune, Lib. Fac. Med.

- Duke, S.O., Romagni, J.G., Dayan, F.E. 2000. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection** **19**: 583-589.
- Duke, S.O. 1985. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. Pp. 91-112. In: S.O. Duke (Ed.) **Weed Physiology**. Boca Raton, CRC Press.
- Durigan, J.C.; Almeida, F.S. 1993. Noções sobre a alelopatia. **Boletim Técnico**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 28 p.
- Einhellig, F.A.; L. Kuan. 1971. Effects of Scopoletin and Chlorogenic acid on stomatal aperture in tobacco and sunflower. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. **98**: 155-162.
- Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology** **5**: 815-24.
- Einhellig, F.A. 1995. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1995, Lavras. **Anais**. Lavras: UFLA, p. 59-74.
- Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal** **88** (6): 886-893.
- Einhellig, F.A. 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. Pp. 479-494. In: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L. (Ed.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press.
- Einhellig, F.A. 2002. The physiology of allelochemical action: Clues and Views. Pp. 1-23. In: Reigosa, M.; Pedrol, N. (eds.). **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo, Universidade de Vigo.
- Einhellig, F.A. 2004. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. Pp. 217-233. In: Macias, F.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H. **Alelopathy**. Boca Raton: CRC Press.
- Elix, J.A.; Wardlaw, J.H. 1996. The Structure of Dissectic Acid, a β -Orcinol meta-Depside from the Lichen *Heterodermia dissecta*. **Australian Journal of Chemistry** **49**: 539-540.
- Ellis, M.K., Whitfield, A.C., Gowans, L.A., Auton, T.R., Provan, W.M., Lock, E.A.; Smith, L.L. 1995. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonyl-benzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. **Toxicology and applied Pharmacology** **133**: 12-19.
- Esimone, C. O.; Adikwu, M. U. 1999. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, **70**: 428-431.
- Fahselt, D. 1994. Secondary biochemistry of lichens. **Symbiosis** **16**: 117-165.
- Fahselt, D. 1996. Individuals, populations and population ecology. Pp. 181-198. In: Nash III, T.H. (Ed.). *Lichen biology*. Cambridge University Press, Great Britain.

- Falcão, E.P.S.; Silva, N.H.; Pereira, E.C.; Gusmão, N.B.; Ribeiro, S.M. 2002. Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmaceutica Bonarense** 21(1): 43-49.
- Ferreira, A.G.; Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 175-204.
- Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 520p.
- Fisher, R. F. 1979: Possible allelopathic effects of reindeer-moss (*Cladonia*) on jack pine and white spruce. **Forest Science** 25: 256–260.
- Fleig, M., Ahti, T.; Stenroos, S. 1995. A Família Cladoniaceae (Líquens) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Napaea** 11:1-29.
- Follmann, G.; Nakagawa, W. 1963. Keinhmmung von reindeer-moss (*Cladonia*) on jack pine and whit spruce. **Die Naturwissenschaften**, 22: 696-697.
- Follman, G.; Peters, R. 1966. Flechtenstoffe und Bodenbildung. **Z. Naturwissenschaften** 21, 386-387.
- Frahm, J.P.; Specht, A.; Reifenrath, K. 2000. Allelopathic effect of crustaceous lichens on epiphytic bryophytes and vascular plants. **Nova Hedwigia** 70 (1/2): 245-254.
- Friebe, A.; Roth, U.; Kuck, P.; Shnabls, H.; Shulz, M. 1997. Effects of 2-4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H ATPase. **Phytochemistry** 44 (6): 979-983.
- García, I.B; Cifuentes, C.; Vicente, C. 1980. L-usnate-urease interactions: biding-sites for the ligand. **Z. Naturwissenschaften** 35: 1098-1100.
- Garcia-Junceda, E.; Vicente, C. 1986. The use of immobilized cells to stabilize orsellinate depside hydrolase of *Pseudevernia furfuracea*. **Plant Cell Reports** 5: 155-157.
- Gardner, C.R.; Mueller, D.M.J. 1981. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. **American Journal of Botany** 68 (1): 87-95.
- Gauslaa, Y. 2005. Lichen palatability depends on investments in herbivore defense. **Oecologia** 143: 94-105.
- Gershenzon, J. 1993. The cost of plant chemical defenses against herbivory: a biochemical perspective. Pp.105-173. In: Bernays, E.A. (Ed.), Plant-Insect interaction. Boca Raton: CRC Press.
- Giordano A., Cannio R., La Cara F., Bartolucci S., Rossi M., Raia C. A. 1999. Asn249Tyr substitution at the coenzyme binding domain activates *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase and increases its thermal stability. **Biochemistry** 38: 3043-54.

- Glass ADM. 1973. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. **Plant Physiology** 51: 1037-1041.
- Glass A.D.M.; Dunlop J. 1974. Influence of phenolic acids on ion uptake. IY Depolarization of membrane potentials. **Plant Physiology** 54: 855-858.
- Gmelin, L. 1858. Handbuch der organischen. **Chemie Paris** 5 (1): 94-97.
- Gniazdowska, A.; Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologica Plantarum** 27: 395-407.
- Goldner, W. R., Hoffman, F. M.; Medve, R. J. 1986: Allelopathic effects of *Cladonia cristatella* on ectomycorrhizal fungi common to bituminous strip-mine soils. **Canadian Journal of Botany** 64: 1586–1590.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P., Turland, N.J. & Hawksworth, D.L. (eds.) 2003. **Código Internacional de Nomenclatura Botânica** (Código de Saint Louis). Adotado pelo XVI Congresso Internacional de Botânica, Saint Louis, Missouri, julho-agosto de 1999. Tradução de Bicudo, C.E.M. & Prado, J. Instituto de Botânica (IBt), International Association for Plant Taxonomy (IAPT), Sociedade Botânica de São Paulo (SBSP). São Paulo. 162 p.
- Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives critical. **Reviews in Plant Sciences** 21: 273–322.
- Hale-Jr., M. E. 1983. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 90p.
- Hamada, N.; Miyagawa H. 1995. Secondary metabolites from isolated lichen mycobionts cultured under different osmotic conditions. **Lichenologist** 27 (3): 201–205.
- Hamada, N.; Miyagawa, H.; Miyawaki, H.; Inoue, M. 1996. Lichen substances in mycobionts of crustose lichens cultured on media with extra sucrose. **The Bryologist** 99: 71-74.
- Hammer, S. 2003. Notocladonia, a New Genus in the Cladoniaceae. **The Bryologist** 106 (1): 162-167.
- Han, D.; Matsumaru, K.; Rettori, D.; Kaplowitz, N. 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology** 67: 439–451.
- Harbone, J. B. 1993. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 4 ed. Academic Press, Cambridge. 318 p.
- Harborne, J.B. 1997, Plant Secondary Metabolism. Pp. 132-155. .In: Crawley, M.J. (Ed.). **Plant Ecology**. Oxford: Blackwell Science.
- Harper J.R; Balke N.E. 1981. Characterization of inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. **Plant Physiology** 68: 1349-1353.

- Harrison, S.K.; Loux, M.M. 1995. Chemical weed management. Pp. 101-154. In: Smith, A.E. (Ed.) **Handbook of weed management systems**. New York: Deller Marcel.
- Hatzios, K.K. 1987. Biotechnology applications in weed management. Now and in the future. **Advances in Agronomy** **41**, p.325-373.
- Hawksworth, D.L.; Hill, D.J. 1984. **The lichen-forming fungi**. Blackie & Sons. ltd. Glasgow.
- Hess, D. 1960. Untersuchungen über die hemmende wirkung von Extrakten aus Flechtenpilzen auf das Wachstum von *Neurospora crassa*. **Z. Bot.** **48**: 136-142.
- Higuchi, M.; Miura, Y.; Boohene, J.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Yoshimura, I.; Yamada, Y. 1992. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Med.** **59**(3): 253-255.
- Higuchi, M.; Miura, Y.; Boohene, J.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Yoshimura, I.; Yamada, Y. 1993. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Medica** **59**: 253-255.
- Hirabayashi, L.; Iehata, S.; Ito, M.; Shigeta, S.; Narui, T.; Shibata, S. 1989. Inhibition effect of a lichen polysaccharide sulphate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **37**: 2410-2412.
- Hirayama, T.; Fujikawa, F.; Kasahara, T.; Otsuka, M.; Nishida, N.; Mizuno, D. 1980. Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. **Yakugaku Zasshi**. **100** (7): 755-759.
- Hoagland, R.E.; Williams, R.D. 2004. Bioassays Useful Tools for the Study of Allelopathy. Pp. 315-341. In: Macias, F.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H. **Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals..** Boca Raton: CRC Press.
- Honda, N.K. 1997. Líquens de Mato Grosso do Sul – estudo químico e avaliação da atividade biológica. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica. 163 p.
- Honda, N. K.; Vilegas, W. 1998. A química dos líquens. **Química Nova** **21** (6): 110-125.
- Honegger, R. 1991. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **42**: 553–578.
- Horsley, S.B. 1977. Allelopathic interference among plant. II. Pp. 93-136. In: H.E. Wilcox; A.F. Hamer [Eds.]. **Physiological modes of action**. Proceedings of the fourth North American forest biology workshop. School of Continuing Education, College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, N.Y.
- Huneck, S.; Schreiber, K. 1972. Wachstumregulatorische Eigenschaften von Flechten und Moss-Inhaltstoffen. **Phytochemistry** **11**: 2429-2434.

- Huneck, S. 1973. Nature of Lichens Substances. V. Ahmajadajin & M.E. Hale. **The Lichens**. London, Academic Press.
- Huneck, S., Hoefle, G. 1978. Struktur and C-NMR Spektroskopie von chlorhaltigen Flechtenxanthonen. **Tetrahedron** **34**, 2491–2502.
- Huneck, S. 2001. New results on the chemistry of lichen substances. Pp. 1-276. *In*: W. Herz; Falk, G.W. Kirby; R.E. Moore (Eds). **Progress in the Chemistry of Organic Products**. New York: Springer.
- Huovinen, K.; Hilten, R. Schantz, M. 1983. Analysis of lichen acids from extracts of *Cetraria islandica* by high performance liquid chromatography. Pp. 294. *In*: **Gesamtkongress der Pharmazeutischen Wissenschaften Die in der Arzneimitelforschung**. Abstracts.
- Huovinen, K.; Ahti, T.; Stenroos, S. 1990. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Cladonia* and group *Furcatae*. **Bibliotheca Lichenologica**, **38**: 209-241.
- Hyvarinen, A.; Meklin, T.; Vepsäläinen, A.; Nevalainen, A. 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity. **International Biodeterioration & Biodegradation** **49** (1): 27-37.
- IAS. 1996. International Allelopathy Society Constitution. **First World Congress on Allelopathy. A science for the Future**.
- Ibi, A.; Tanniguchi, E.; Maekawa, K. 1979. Syntheses and biological activities of tetronic substances in the genus *Cladonia*. **Annales Botanici Fennici** **23**: 173-188.
- Inderjit; Dakshini, K.M.M. 1995. Quercetin and quercetrin from *Pluchea lanceolata* and their effect on growth of asparagus bean. Pp: 86-95. *In*: Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.A. Einhellig (Eds.). **Allelopathy: organisms, processes, and applications**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Inderjit; Weston, L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? **Journal of Chemical Ecology** **26**:2111-2118.
- Inderjit; Duke, S.O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta** **217**: 529-539.
- Ingólfsdóttir, K.; Bloomfield, S.F.; Hylands, P.J. 1985. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrob Agents Chemother** **28** (2): 289-292.
- Ingólfsdóttir, K. 2002. Usnic acid. **Phytochemistry** **61** (7): 729-736.
- Jankay, P.; Muller, W.H. 1976. The relationships among umbelliferone, growth, and peroxidase levels in cucumber roots. **American Journal of Botany** **63** (1): 126-132.
- Kong, C.; Hu, F.; Xu, X. 2002. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles of *Ageratum conyzoides* under stress. **Journal of Chemical Ecology** **28**: 1173-1182.

- Kristmundsdóttir, T.; Aradóttir, H.A.E.; Ingólfssdóttir, K.; Ögmundsdóttir, H.M. 2002. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 54 (11): 1447-1452.
- Kropff, M.J.; H. Walter. 2000. EWRS and the challenges for weed research at the start of a new millennium. **Weed Research** 40:7–10.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. Trad. C.H.B.A. Prado. S.Carlos-SP, Rima Artes e Textos. 531p.
- Larson, R. W. On the independence of positive and negative affect within hour-to-hour experience. **Motivation and Emotion** 11(2): 145-156, 1987.
- Lasceve, G.; Gaugain, F. 1990. Effects of usnic acid on sunflowers and maize plantlets. **Journal Plant Physiology** 136, 723-727.
- Lawrey J.D. 1977. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 194: 49–52.
- Lawrey J. D. 1995. Lichen allelopathy: A review. **American Chemical Society Symposium Series** 582: 26–38.
- Lawrey, J.D. 1987. Nutritional ecology of lichen/moss arthropods. Pp. 209–233. In: Slansky FJ & Rodriguez JG (Eds). **Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders and Related Invertebrates**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Lechowski, Z.; Mej, E.; Białczyk, J. 2006. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. **Environmental and Experimental Botany** 56: 239-244.
- Legaz, M. E.; C. Vicente; C. Ascaso; E.C. Pereira; L. Xavier-Filho. 1986. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochemistry Systematic and Ecology** 14: 575-58.
- Lorber, P.; Muller, W.H. 1976. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany** 63: 196–200.
- Lovett, J.V. 1982. Allelopathy and self-defense in plants. **Australian Weeds** 2: 33-35.
- Macias, F.A. 1995. Allelopathy in the search for natural herbicides models. Pp. 310-329. In: K.M.M.; Inderjit; E.F.A. (Eds.). **Allelopathy. Organisms, Processes and Applications**. American Chemical Society.
- Maia, M.B.S.; Silv, N.H.; Silva, E.F.; Castanho, M.T.; Schuler, A. R. P.; Pereira, E.C. 2002. Antinoceptive activity of extract and atranorin obtained from the lichen *Cladonia dendroides* (des Abb). Athi. **Acta Farmaceutica Bonaerense** 21 (4): 259-264.
- Malicki, J. 1965. The effect of lichen acids on the soil microorganisms. Part I. The washing down of the acids into the soil. **Annales Universitatis Mariae Curie** 20: 239–248.

- Mandava, N.B. 1985. Chemistry and biology of allelopathic agents. Pp. 33–54. In: Thompson, A.C. (Ed.). *The Chemistry of Allelopathy. Biochemical Interactions among the Plants*. A. C. S. Symposium Series 268. American Chemical Society, Washington, DC.
- Mano, A.R.O. 2006. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* s.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. Dissertação de Mestrado, Fortaleza, CE. 102p.
- Marante, F.J.T.; Castellano, A.G.; Rosas, F.E.; Aguiar, J.Q.; Barrera, J.B. 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and antioxidative activity. **Journal of Chemical Ecology** 29 (9): 2049-2071.
- Medeiros, A.R.M. 1990. Alelopatia: importância e suas aplicações. **Horti Sul** 1 (3): 27-32.
- Molisch, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. **Allelopathie**. Verlag, Jena: Gustav Fischer, 106 p.
- Muller, C.H. 1965. Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs. **Bulletin of Torrey Botanical Club** 92 (1): 38-45.
- Nakanishi, T.; Murata, H.; Inatomi, Y.; Inada, A.; Murata, J.; Lang, F.A.; Yamasaki, K.; Nakano, M.; Kawahata, T.; Mori, H.; Otake, T. 1998. Screening of anti-HIV-1 activity of north American plants. Anti-HIV-1 activities of plant extract, and active components of *Lethalia vulpine* (L.) Hue. **Natural Medicines** 52 (6): 521-526.
- Neamati, N.; Hong, H.; Mazumder, A.; Wang, S.; Sunder, S.; Nickalus, M.C.; Milne, G. W.A., Proksa, B.; Pommier, Y. 1997. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Seaching. **Journal of Medicinal Chemistry** 40 (6): 942-951.
- Nash, T.H. 1996. Lichen Biology. Introduction. In: **Lichen Biology**; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge.
- Nasir, H.; Iqbal, Z.; Hiradate, S.; Fujii, Y. 2005. Allelopathic potential of *Robinia pseudo-acacia* L. **Journal of Chemical Ecology** 31: 2179-2192.
- Neves, R. 2005. **Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja**. 87p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.
- Nishimura, H.; Mizutani, J. 1995. Identification of allelochemicals in *Eucalyptus citriodora* and *Polygonum sachalinense*. Pp.74-85. In: Inderjit; K.M.M. Dakshini e F.A. Einhellig (eds.). **Allelopathy - Organisms, Processes and Applications**. Washington, DC: American Chemical Society.
- Nishitoba, Y.; Nishimura, H.; Nishiyama, T.; Mizutani, J. 1987. Lichen acids, plant-growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry** 26 (12): 3181-3185.

- Oliveira, A. F. M.; Costa-Filho, L. O.; Barbosa, D. C. A.; Pereira, E. C.; Silva, N. H. 1991. Ação alelopática de extratos brutos de *Cladonia dendroides* (líquen), sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface). **Resumos do IV Congresso Nordestino de Ecologia**. Sociedade Nordestina de Ecologia, Recife-PE. P.28.
- Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2004. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit on sesame seed germination and seedling growth. **Allelopathy Journal** 13 (2):201-210.
- Oswiecimska, M.; Sendra J.; Janeczko, Z. 1979. Actimutic activity of some *Cladonia* species native in Poland. II: Search for preparations showing the stable biological activity and cytostatic screening of dried extract. **Herba Polonica** 29: 271-279.
- Peñuelas, J.; Ribas-Carbó, M.; Giles. 1996. Effect of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. **Journal of Chemical Ecology** 22: 801-805.
- Pereira, E.C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 240p.
- Pereira, R.W.; Marcelli, M.P. 1989. Líquens da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Anais do Congresso Nacional de Botânica. **Acta Botanica Brasilica** 3 (2): 89-94.
- Pereira, E.C.; Vicente, C.; Legaz, M.E.; Silva, N.H.; Silva, E.F.; Andrade, L.H.C. 1999. Production of Lichen Metabolites Through cell Immobilization by *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier-Filho. **Phyton** 39: 79-89.
- Pereira, E.C.; Gomes, A.; Silva, N.H.; Ribeiro, S.M. 2002. Bioprodução de metabólitos de *Heterodermia leucomela* (Líquen) a partir de imobilização celular. In: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2002, Cuiabá. **Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**.
- Piervittori, R.; Alessio, F.; Maffei, M. 1994. Fatty acid variations in the lichen, *Xanthoria parietina*. **Phytochemistry** 36: 853-856.
- Pires, N.M.; Prates, H.T.; Pereira, I.A.; Oliveira, R.S.; Faria, T.C.L. 2001. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola** 58 (1): 61-65.
- Poser, G.L.; Mentz, L.A. 2000. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mantz, L.A.; Patrovick, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: UFGSC, 821 p.
- Poykko, H.; M. Hyvarinen; M. Backor. 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. **Ecology** 86: 2623-2632.
- Proška, B.; Sturdiková, M.; Prónayová, N.; Liptaj, T. 1996. (–)-usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Die Pharmazie** 51: 195–196.

Purvis, O.W. 2000. **Lichens**. The National History Museum, London, 112 pp.

Putnam, Linda L. 1983. The interpretive perspective: an alternative to functionalism. Pp. 31–54. *In*: Putnam, Linda L.; Pacanowsky, M.E. (Eds.). **Communication and organizations: an interpretive approach**. Beverly Hills, CA: Sage.

Putnam, A.R.; Duke, W.B. 1978. Allelopathy in agrossistemas. **Annual Review of Phytopathology 16**: 43-451.

Putnam, A.R. 1985. Weed allelopathy. Pp. 131-155. *In*: Duke, S.O. (Ed.) **Weed physiology**. Florida: CRS Press,

Putnam, A.R.; Tang, C.S. 1986. Allelopathy: State of the science. Pp: 1-19. *In*: A.R. Putnam; C.S. Tang (Eds.). **The science of allelopathy**. John Wiley, New York.

Pyatt, F. B. 1967. The inhibitory influence of *Peltzgera canzna* on the germination of graminaceous seeds and the subsequent growth of the seedlings. **The Bryologist 70**: 326-329.

Pyatt, F.B. 1973. Lichen propagules. Pp. 117–145. *In*: Ahmadjian, V.; Hale, M. (Eds.). **The lichens**. Academic Press, New York.

Quilhot, W., Thompson, W. J.; Vidal, B.S.; Campos, P.G. 1981. Lichen substances and the plant growth. I. The effect of rocellic acid on development of adventitious roots in cuttings of *Tradescantia virginiana*. **Journal of Hattori Botanical Laboratory 49**: p. 273-277.

Raven, P.H., Evert, R.; Eichhorn, S.E. 2001. **Biologia Vegetal**. 6a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 906 p.

Reddy, P.V.; Rao, P.S. 1978. Influence of some lichen substances on mitosis in *Allium cepa* root tips. **Indian Journal of Experimental Biology 16**: 1019- 1021.

Reigosa, M.J.; Sanchez-Moreiras, A. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences 18**: 877-608.

Reutimann, P.; Scheidegger, C. 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. **Journal of Chemical Ecology 13**: 363–369.

Ribeiro, S.M.; Pereira, E.C.; Nicácio, S.; Falcão, E.P.; Gusmão, N.B.; HONDA, N. & Quilhot, W. 2002. **Mitteilungen aus dem Institute für Allgemeine Botanik Hamburg 30-32**: 187-194.

Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press.

Rice, E.L. 1986. Allelopathic growth stimulation. *In*: A.R. Putnam and C.S. Tang. (Eds.). **The Science of Allelopathy**. New York. John Wiley & Sons.

- Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. 1992. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. Pp. p. 443-472. *In: Rizvi, S.J.H.; Rizvi, H. (Eds.) Allelopathy: Basic and applied aspects.* London, Chapman & Hall.
- Rodrigues, L.R.A.; Almeida, A.R.P.; Rodrigues, T.J.D. 1993. Alelopatia em forrageiras e pastagens. Pp. 100-129. *In: Simpósio Sobre Ecossistemas de Pastagens*, 2., Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FUNEP/FCAV.
- Rogers, R.S. 1999. Agrochemicals Uprooted. **Chemical & Engineering News** 77: 17-20.
- Rojas, I.S.; Lotina-Hennsen, B.; Mata, R. 2000. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Natural Products** 63: 1396-1399.
- Romagni, J.G., Meazza, G.; Nanayakkara; D. Dayan, F.E. 2000. The Phytotoxic Lichen Metabolite, Usnic Acid, is a Potent Inhibitor of Plant *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. **FEBS Letters** 480 (2-3): 301-305.
- Romagni, J.G.; F.E. Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Pp. 13-33. *In: Macias, F.A. (Ed.). Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. In allelopathy.* CRC press LLC, Boca Raton, Fla.
- Rondon, Y. 1966. Action inhibitrice de l'extrait du lichen *Roccellnijiicoides* (Dicks.) Vain. sur la germination. **Bulletin Société Botanique de France** 113: 1-2.
- Rundel, P.W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. **Biochemical Systematics and Ecology** 6: 157- 170.
- Sanders, W.B. 2001. Lichens: the interface between Mycology and Plant Morphology. **BioScience** 51 (12): 1025-1035.
- Santos, N.P. 1996. Estudo comparativo d atividade antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra diferentes tumors sólidos experimentais. Dissertação de Mestrado, UFPE, 112p.
- Santos, P.N.; Pereira, E.C.G.; Lima, R.C.; Honda, K.N.; Silva, M.P.C. & Silva, N.H. 1997. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (Líquen). **Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas** 2 (2).
- Schultz, A. 1991. **Introdução à Botânica Sistemática**. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade, 294 p.
- Schreiner, O.; Sullivan, M. X. 1909. Soil fatigue caused by organic compounds. **Journal of Chemical Biology** 6: 39-50.
- Sedia, K.G.; Ehrenfeld, J.G. 2003. Lichens and mosses in the New Jersey Pinelands and the genesis of alternate stable states in the vascular plant community. **Oikos** 100: 447-458.

- Sedia, E.; Ehrenfeld, J.G. 2005. Differential effects of lichens, mosses and grasses on respiration and nitrogen mineralization in soils of the New Jersey Pinelands. **Oecologia** **144** (1): 137-147.
- Seigler, D.S. 1996. Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. **Agronomy Journal** **88** (6): 876-885.
- Shatz, A. 1963. Soil microorganisms and soil chelation. The pedogenic action of lichens and lichen acids. **Agricultural and Food Chemistry** **11**: 112-18.
- Shibamoto, T.; Wei, C.I. 1984. Mutagenicity of lichen constituents. **Environment Mutagenesis** **6**: 757-762.
- Shibuya, M.; Ebizuka, Y.; Noguchi, H.; Iitaka, Y.; Sankawa, U. 1983. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 4-Omethylecryptochlorophaeic acid synthesis of monomeric arylcarboxylic acids for inhibitory activity testing and x-rayanalysis of 4-o-methylecryptochlorophaeic acid. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **31** (2): 407-413.
- Silva, F. P. 2007. **Influência de *Cladonia salzmannii* na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera e desenvolvimento de plântulas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco.
- SINDAG 2002 – Sindicato Nacional da Indústria para Defesas Agrícolas - <http://www.sindag.com.br/index.php3> – 20/11/2008
- SINDAG 2008 – Sindicato Nacional da Indústria para Defesas Agrícolas - <http://www.sindag.com.br/index.php3> – 20/11/2008
- Siqueira, J. O.; Nair, M. G.; Hammerschimdt, R.; Safir, G. R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial syatems. **Critical Reviews in Plant Sciences** **10** (1): 63-121.
- Slansky F. 1979. Effect of the lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae of the yellow-striped armyworm, *Spodoptera ornithogalli*. **Environmental Entomology** **8**: 865–868.
- Smith, G. M. 1955. **Botânica Criptogâmica**. Vol. 1. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 527p.
- Souza Filho, A.P.S; Alves, S.M. 2002. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 260p.
- Stuelp-Campelo, P. M. A.; Oliveira, M. B. M.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Carbonero, E. R.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. 2002. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology** **2**: 691-698.
- Syers, J. K. 1969. Chelating ability of fumarprotocetraric acid and *Parmelia conspersa*. **Plant and Soil** **31**: 205-208.

- Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. **Annual Review of Plant Physiology** **28**: 479-501.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Trad. Eliana Rebonato Santarém et al., Porto Alegre: Artmed editora, 719 p.
- Takai, M.; Uehara, Y.; Beisler, J. A. 1979. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **Journal of Medicinal Chemistry** **22**: 1380-1384.
- Tehler, A. 1996. Systematics, phylogeny and classification. Pp. 217-239. In: Nash III, T.H. (Ed.). **Lichen biology**. Cambridge University Press, Great Britain.
- Umezawa, K.; Muramatsu, S.; Ishizuka, M.; Sawa, T.; Takeuchi, T.; Matsushima, T. 1983. Inhibition of histidine-decarboxylase and tumor promoter-induced arachidonic-acid release by lecanoric acid analogs. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **110** (3): 733-739.
- Vainio, E.A. 1894. Monographia Cladoniarum universalis. II. **Acta Societatis Pro Flora et Fauna Fennica** **10**: 1-498.
- Vainstein, E.A.; Topisheva, T.Y. 1975. Effect of lichen extracts on higher plants. **Botanicheskii Zhurnal (Leningrad)** **60** (7): 1004-101.
- Van Sumere, C. F.; Dedonder, A. 1971. The effect of phenolics and related compounds on the growth and respiration of *Chlorella vulgaris*. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie** **65**: 70-80.
- Vartia, K. O. 1973. Antibiotics in lichens. In: V. Ahmadian and M. E. Hale (Eds.). **The lichens**. Academic Press, New York.
- Vasconcelos, T. L. 2007. **Efeito do suprimento exógeno de uréia na produção de substâncias degradadoras do migmatito pelo líquen *Cladonia verticillaris***. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco.
- Vavasseur, A.; Gautier, H.; Thibaud, M.-C.; Lascève, G. 1991. Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis* L. **Journal of Plant Physiology** **139**: 90-94.
- Vicente, C. L. Xavier- Filho. 1979. Urease regulation in *Cladonia verticillaris*. **Phyton** **37**: 137-144.
- Vicente, C.; Legaz, M.E. 1988. Lichen enzymology. pp. 239-284. In: Galun M. (Ed.), **Handbook of Lichenology**, CRC Press. Boca Raton.
- Vijayakumar, C.S.; Viswanathan, S.; Kannappa Reddy, M.; Parvathavarthini, S.; Kundu, A.B.; Sukumar, E. 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia** **71**: 564-566.
- Vyvyan, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron** **58** (9): 1631-1646.

- Waller, G.R. 1999. Introduction. In: Macias, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H.G. (Eds.) **Recent advances in allelopathy**. Cadiz, serv. Pub. Univ. Cadiz.
- Whiton, J.C.; Lawrey, J.D. 1982. Inhibition of *Cladonia cristatella* and *Sordaria fimicola* ascospore germination by lichen acids. **The Bryologist** **85** (2): 222-226.
- Whiton, J.C.; Lawrey, J.D. 1984. Inhibition of crustose lichen spore germination by lichen acids. **The Bryologist** **87** (1): 42-43.
- Whiton, J.C.; Lawrey, J.D. 1984. Inhibition of crustose lichen spore germination by lichen acids. **The Bryologist** **87** (1): 42-43.
- Whittaker, R.H.; Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interaction between species. **Science** **171** (3973): 757-770.
- Wink, M. 1990. Physiology of secondary product formation in plantas. Pp. 23-41. In: B.V. Charlwood; M.J.C. Rhodes (Eds.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon.
- Xavier-Filho, L.; Arruda, E.C.; Paulo, M.Q.; Legaz, M.E.; Vicente, C. 1984. Chemotaxonomical study on *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. 2nd and *Cladonia calycantha* (Del.) Nyl. **Phyton** **44**: 115-119.
- Xavier-Filho, L.; Paulo, M. Q.; Vicente, C.; Legaz, M.E. 1985. Phenols from *Cladonia sandstedei* analyzed by HPLC. **Cryptogamie. Bryologie, lichenologie** **6** (2):143-150.
- Xavier-Filho, L.; Leite, J. B. M.; Lima, E.O. 1990. Atividade antimicrobiana de líquens antárticos. **Boletim da Sociedade Broteriana** **63**: 93-98.
- Xavier-Filho, L.; Legaz, M.E.; Cordoba, C.V.; Pereira, E.C. 2006. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 617.
- Yague, E.; Estevez, M. P. 1988. The epiphytic lichen *Evernia prunastri* synthesizes a secretable cellulase system that degrades crystalline cellulose. **Physiologia Plantarum** **74**: 515-520.
- Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Higuchi, M.; Kinoshita, Y.; Yoshimura, I. 1993. Using lichen tissue cultures in modern biology. **The Bryologist** **96** (3): 384-393.
- Yano, A. M. 1994. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula *Allium cepa***. 126f. Dissertação. Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.
- Zobel, A. M.; Lynch, J. M. 1997. Extrusion of UV-absorbing phenolics in *Acer* spp. In response to UV na freenzing temperature. I. UV A-absorbing compounds on the surface of *Acer saccharum* and *Acer platamoides* autumm leaves. **Allelopathy Journal** **4**: 269-276.

Zopf, W. 1907. **Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung**, Fischer, Jena.

Capítulo 1

Potencial Alelopático de Extratos Orgânicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. na Germinação e no Crescimento Inicial de *Lactuca sativa* L.

Potencial Alelopático de Extratos Orgânicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. na Germinação e no Crescimento Inicial de *Lactuca sativa* L.

Rafaela Carvalho Tigre¹, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira², Nicácio Henrique da Silva³, Mauro Guida dos Santos⁴, Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo⁵

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: biotigre@gmail.com
2. Departamento de Ciências Geográficas; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: eugenia.pereira@pq.cnpq.br
3. Departamento de Bioquímica - Laboratório de Produtos Naturais; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: nhsilva@uol.com.br
4. Departamento de Botânica - Laboratório de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: mauroguida@yahoo.com.br
5. Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Email: bressan@cpqam.fiocruz.br

RESUMO - (Potencial alelopático de extratos orgânicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. na germinação e no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.). Metabólitos líquênicos exibem uma variedade de efeitos alelopáticos. Essa ação é particularmente importante na defesa desses organismos, através de efeitos como inibição e estimulação, o que pode sugerir aplicações nas diversas áreas da agricultura. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito alelopático de extratos orgânicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. na germinação e no crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Foram testadas cinco concentrações (0,01; 0,1; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL) de extratos etéreo, clorofórmico e acetônico além do controle com água destilada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições em condições de laboratório. Os extratos de *C. verticillaris* não causaram efeito alelopático sobre a germinabilidade final e a primeira contagem, mas influenciaram significativamente o tempo médio (T.M) e o índice de velocidade de germinação (IVG) de *L. sativa*. Para o comprimento do eixo hipocótilo-radícula e dos parâmetros foliares (comprimento, largura e área), foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos para os extratos testados, observando efeitos alelopáticos positivos e negativos.

Termos para indexação: *Cladonia verticillaris*, líquens, alelopatia

ABSTRACT – (Allelopathic potential organics extract of *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. in germination and growth of *Lactuca sativa* L.). Lichen metabolites exhibit a range of allelopathic effects. This action is particularly important for defense of those organisms, through inhibition and stimulation effects, what may suggest applications in several subjects in agriculture. The objective of this research was to evaluate the allelopathic effect of *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. organic extracts on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. Five concentrations (0.01; 0.1; 1.0; 2.5 e 5.0 mg/mL) of ether, chloroform and acetone extract were tested, besides the use of distilled water as control. The experimental delineament was totally casualized, with four repetitions in laboratory conditions. The *C. verticillaris* extracts did not cause allelopathic effect on final germination, and the first count, but significantly influenced on the mean time (MT) and the germination velocity index (GVI) of *L. sativa*. For the axe size leaf and root and leave parameters (size, xx and area), was possible to observe significative difference between the treatments for tested extracts, observing positive and negative allelopathic effects.

Keywords: *Cladonia verticillaris*, lichen, allelopathy

Introdução

A alelopatia é definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, microrganismos e fungos que, uma vez liberados no ambiente, influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos naturais ou implantados, seja de forma positiva ou negativa (Carmo *et al.*, 2007).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que atuam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo, *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate), por isso muito utilizada em biotestes de laboratório (Ferreira & Áquila, 2000).

Ao longo das últimas décadas, observa-se um crescente interesse na busca de substâncias com propriedades alelopáticas, podendo levar à descoberta de um herbicida natural, que aja diretamente na planta invasora e não cause agressões ao meio ambiente. Alguns trabalhos foram publicados nos últimos anos envolvendo a prospecção de substâncias com atividades alelopáticas (Souza-Filho & Alves, 2000; Souza-Filho *et al.*, 2005). O principal estímulo para a realização dessas pesquisas é a redução do uso de herbicidas tradicionais, diminuindo custos da produção agrícola e o impacto ambiental resultante da utilização destes agrotóxicos.

A competição gerada pelo desenvolvimento de plantas infestantes em áreas de cultivos comerciais influencia o desenvolvimento destas, reduzindo a sua produtividade e a qualidade final do produto. Existem diversos compostos bioativos naturais com propriedades inexploradas, cuja descoberta dos sítios de ação auxiliará na identificação de novas moléculas herbicidas (Duke *et al.*, 2002). Existem previsões de que o uso de herbicidas pode ser reduzido se os genes para efeitos alelopáticos puderem ser identificados e transferidos entre genótipos (Wu *et al.*, 1999), mas são necessários trabalhos prévios para identificação de espécies com potenciais alelopáticos (Neves, 2005). Pesquisas nessa área são de grande importância para otimização do sistema de produção de forma ambientalmente correta e econômica, pela redução de aplicações de herbicidas, uma vez que o Brasil é o quinto maior consumidor de agrotóxicos do planeta, sendo consumidas 150.000 toneladas de agrotóxicos/ano, das quais 33% são referentes aos herbicidas (Santos & Abreu, 2001).

Produtos naturais são fontes de muitos pesticidas, usados diretamente como extratos brutos ou como compostos puros. Assim, ao invés de serem usados diretamente, muitos são usados para identificação de ingredientes ativos no desenvolvimento de pesticidas a partir de produtos naturais. Existem muitos exemplos desses produtos naturais usados como fungicidas, inseticidas e até herbicidas. Entre eles, Actinonin, Breleldin, Fumonisin, Sorgoleone, Tentoxin, Tricolorin, Thiolactomycin e Bialaphos (Duke *et al.*, 2002).

Metabólitos liquênicos exibem uma variedade de efeitos alelopáticos. Essa ação é particularmente importante na defesa desses organismos, através de efeitos como inibição e estimulação, o que pode sugerir aplicações nas diversas áreas da agricultura.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi analisar o potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e seu efeito sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.

Material e Métodos

Extração - *C. verticillaris* foi coletada no município de Saloá, 273 km do Recife. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) e triturado. Os materiais secos e moídos foram submetidos à extração sucessiva em um aparelho de soxhlet com éter, clorofórmio e acetona, seguindo a série eluotrópica. Foram utilizados 150 g do material liquênico para 2 L de cada solvente mencionado. Após cada extração, os materiais foram filtrados e encaminhados para evaporador rotativo à vácuo para total eliminação do solvente.

Análise Química - Determinou-se o pH dos extratos. Foram realizados ensaios em cromatografia de camada delgada (CCD) para detecção qualitativa das substâncias e do ácido fumarprotocetrárico na espécie estudada, sendo realizadas em cromatoplasas de sílica Gel Merck F₂₅₄₊₃₆₆, desenvolvidas em sistema unidimensional de solventes B (hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 130:80:20, v/v), de acordo com a metodologia de Culberson (1972). A revelação consistiu em pulverizações de ácido sulfúrico a 10%, aquecimento a 100°C e visualização sob luz UV curta (256 nm) e longa (366 nm). Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de R_f. As amostras também foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido HITACHI, acoplado a detector de ultravioleta a 254 nm, em coluna de fase reversa C18. A fase móvel constituiu por

metanol/água/ácido acético na proporção de 80:19, 5; 0,5 v/v, sob um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, atenuação 0,04 e temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) segundo metodologia de Legaz & Vicente (1983). As amostras foram injetadas em concentrações de 0,01 mg/mL em metanol. Foram realizadas curvas de calibração para os padrões dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO). Os cromatogramas foram interpretados de acordo com o tempo de retenção das substâncias na coluna e área do pico, correlacionadas às equações da reta de calibração para determinar as concentrações de FUM e PRO nas amostras.

Bioensaio - O bioensaio de germinação foi realizado em câmara de germinação do tipo BOD com fotoperíodo de 12 h e temperatura alternada de 23 a 27°C . Os testes foram realizados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, revestidas com duas folhas de papel filtro previamente autoclavadas a 120°C por 30 minutos. Em cada placa foram adicionados 3,0 mL de cada extrato a ser testado nas concentrações de 0,02; 0,2; 2,0; 5,0 e 10,0 mg/mL. Em seguida, as placas contendo os papéis de filtro umedecidos com extrato, foram secas em um fluxo laminar durante 12h. Decorrido este período, o papel de filtro foi reumedecido com 6,0 mL de água destilada, obtendo-se a concentração 0,01; 0,1; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL. O controle foi obtido com o uso de água destilada.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 aquênios de *L. sativa* por placa. A taxa de germinação foi verificada a cada 12 horas durante sete dias possibilitando a avaliação da primeira contagem (terceiro dia), germinabilidade total, do tempo médio (T.M), do índice de velocidade germinação (IVG), e da biometria segundo a metodologia de Brasil (1992), Laboriau (1983), Silva & Nakagawa (1995), Maguire (1962) e Benicasa (1988), respectivamente. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão radicular e classificadas em normais ou anormais, de acordo com as especificações de Brasil (1992). As raízes primárias foram observadas sob microscópio eletrônico de varredura (MEV), para observação de alterações micromorfológicas.

Após sete dias de crescimento, o comprimento da radícula de cada plântula foi medido com o auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5%. Os valores de percentagem foram transformados em arco seno ($\sqrt{\%}$) (Labouriau, 1983).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Cortes de radículas inteiras de *L. sativa* obtidos foram fixados por 24 h em 4% de glutaraldeído (G.A) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato por 1 h e desidratados em séries crescentes de etanol, secos pelo método do ponto crítico, revestido com ouro e examinados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV - JEOL).

Resultados e Discussão

A germinabilidade final (180h) e a primeira contagem (96 h) de *L. sativa* não foram afetadas pelos extratos de *C. verticillaris* nas cinco concentrações testadas (Tab.1 e Fig. 1). Esses resultados corroboram com os obtidos por Yano (1994) que também não obteve resultados significativos ao analisar extratos dessa espécie sobre o índice de germinação de *Allium cepa*. Porém, Follmann e Nakagawa (1963), Rondon (1966), Dauric e Rondon (1976) Sedia e Ehrenfeld (2003), Romagni *et al.* (2004), Han *et al.* (2004) e Campos *et al.* (2008) listam espécies de plantas superiores que apresentaram inibição da germinação de sementes frente a extratos liquênicos.

Tabela 1. Resultado da análise de variância da germinabilidade e da primeira contagem dos aquênios de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	GERMINABILIDADE			PRIMEIRA CONTAGEM		
	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	0,644	5	0,667017	1,523	5	0,198163
Extrato	1,067	2	0,351110	0,881	2	0,420254
Concentração*Extrato	0,715	10	0,706301	0,924	10	0,518519

G.L: grau de liberdade

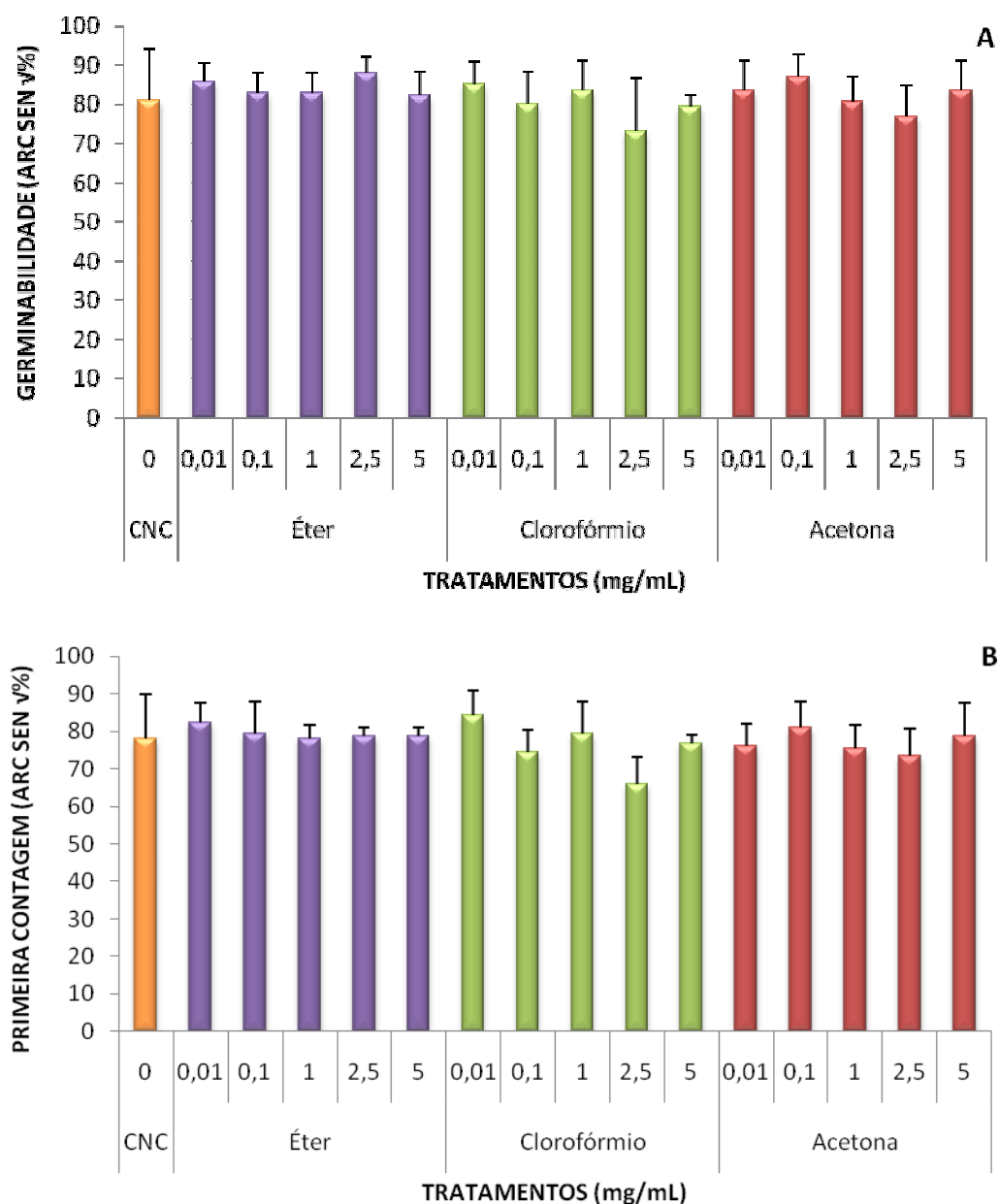


Figura 1. Valores médios de percentagem de germinação (A) e primeira contagem (B) dos aquênios de *Lactuca sativa* L. submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (CNC). A. Plântulas com sete dias de idade. B. Plântulas com três dias de idade.

Entretanto, o índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo médio (T.M) causaram atraso e estímulo significativos na germinação que variaram em função da concentração (Fig 2). Todos os extratos na concentração 0,01 mg/mL aumentaram o vigor das plântulas de *L. sativa*. Apesar de essa ser a concentração mais baixa testada, os resultados não representam o modelo dose-redução, pois os extratos etéreos nas concentrações 2,5 e 1,0

mg/mL também aumentaram o vigor das plântulas, no entanto o extrato etéreo 5,0 mg/mL e o clorofórmico 2,5 mg/mL causaram atraso na germinação, diminuindo conseqüentemente o vigor das plântulas. Houve diferença significativa no efeito dos extratos quando analisados sobre a concentração 2,5 mg/mL, onde o extrato etéreo aumentou o IVG e o clorofórmico reduziu. O extrato acetônico 5,0 mg/mL ocasiona atraso na germinação até o segundo dia e posteriormente ocorreu uma aceleração no processo germinativo em relação aos demais tratamentos e ao controle. Na tabela 2, pode-se observar que o parâmetro tempo médio foi mais sensível, segundo as variáveis analisadas (extrato e concentração) que o IVG.

Segundo Reigosa *et al.* (1999) os efeitos dos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos são dependentes da concentração, ou ao menos se espera que ocorram estimulações em baixas e inibições em altas. Para Ferreira & Áquila (2000), o efeito alelopático pode não ocorrer sobre a germinabilidade (percentual final de germinação no tempo), mas ocorrer sobre a velocidade de germinação e provocar alterações na curva de distribuição da germinação, alongando a curva através do eixo do tempo. Resultados semelhantes foram obtidos por Prates *et al.* (2000), Periotto (2003), Oliveira *et al.* (2004), Gatti *et al.* (2004), Correia *et al.* (2005), e Aires (2007) que também não observaram interferências significativas de extratos na germinação de plantas testes. Oliveira (2003) e Aires (2007) também observaram alterações no pico de germinação causadas por aleloquímicos. Segundo Bewley & Black (1978) e Labouriau (1983), alterações nas curvas de germinação indicam interferências nas reações metabólicas que culminam na germinação.

Tabela 2. Resultado da análise de variância do tempo médio e do IVG dos aquênios de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	TEMPO MÉDIO			IVG		
	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	18,050	5	<0,001	6,985	5	< 0,005
Extrato	3,710	2	<0,005	1,334	2	0,271991
Concentração*Extrato	7,498	10	<0,001	3,301	10	< 0,005

G.L: grau de liberdade

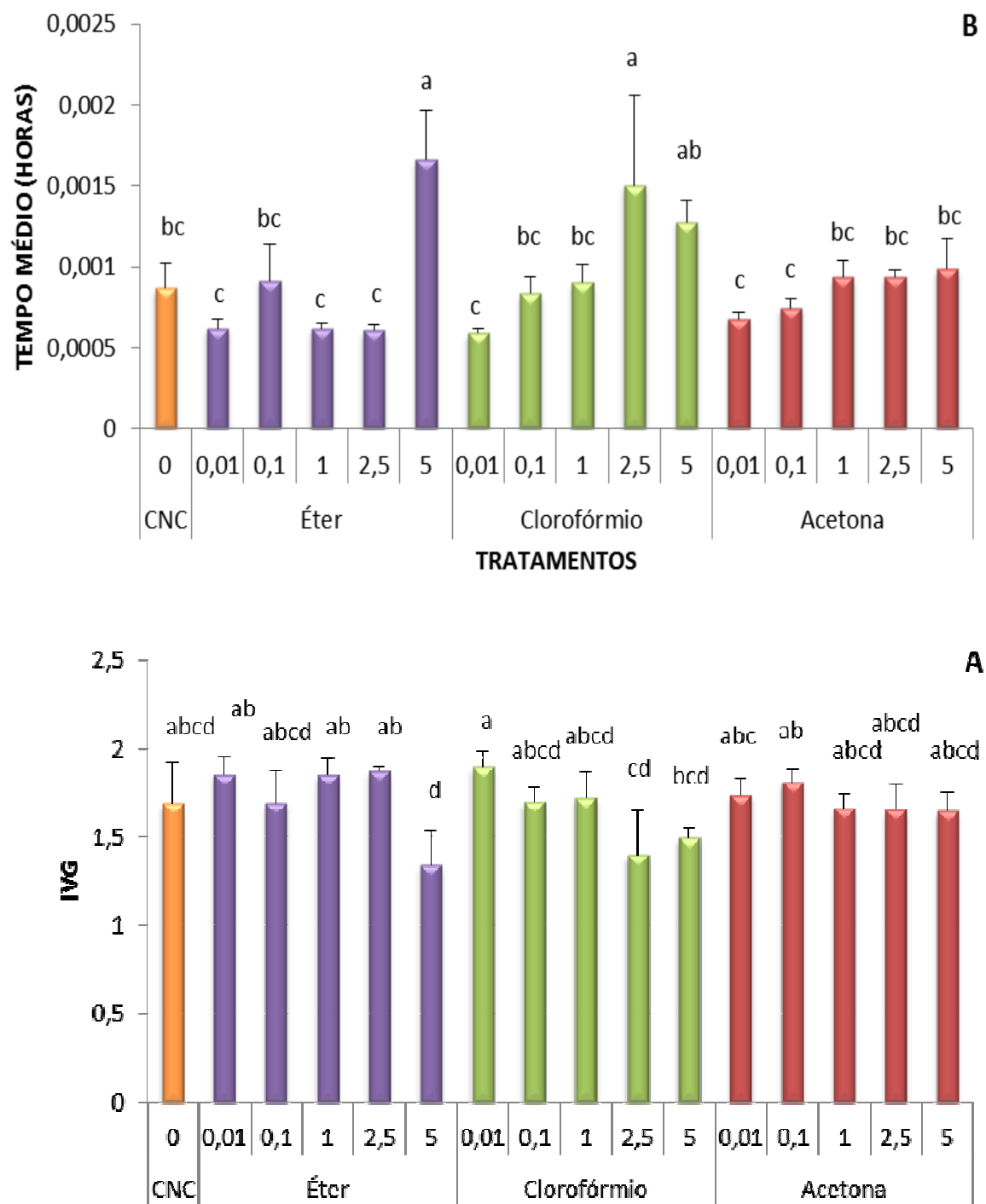


Figura 2. Valores médios do índice de velocidade de germinação (A) e do tempo médio (B) das plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas por sete dias à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação à variável comprimento radicular foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 3). Os extratos evidenciaram ação de acordo com o modelo dose-estímulo até a concentração 2,5 mg/mL, onde à medida que se aumentava a concentração, aumentava-se a indução do crescimento. A partir dessa concentração, houve uma drástica redução no comprimento radicular na concentração 5,0 mg/mL. Os maiores estímulos foram causados pelos extratos acetônicos 1,0 mg/mL (146,52%) e 2,5 mg/mL (138,18) em relação ao controle. Todos os extratos induziram o crescimento radicular na concentração 2,5 mg/mL. As maiores inibições foram causadas pelo extrato clorofórmico (80,57%) e etéreo (36,36%) a 5,0 mg/mL respectivamente, em relação ao controle. Nessa concentração o extrato acetônico não produziu efeito significativo.

Tukey Junior (1969) afirma que nem todas as substâncias aleloquímicas são inibidoras, e podem, ao contrário, serem estimulantes, citando como exemplo os nutrientes minerais, aminoácidos e ácidos orgânicos, carboidratos e reguladores de crescimento. Em estudos com plantas superiores, observou-se que aleloquímicos que ocorrem naturalmente em *Eurycoma longifolia*, *Brucea* spp, *Quassia indica*, *Castela* spp e *Ailanthus* spp, também são fitotóxicas e reduzem o crescimento da radícula de *L. sativa* (Dayan *et al.*, 1999). Substâncias líquênicas também têm sido observadas com efeitos tóxicos direto em plantas superiores (Romagni *et al.*, 2000; Latkowska *et al.*, 2006; Lechowski *et al.*, 2006). Romagni *et al.* (2004) encontraram um grupo análogo de antraquinona de líquens que inibia a formação de raiz primária de plantas.

Tabela 3. Resultado da análise de variância do comprimento do hipocótilo e da radícula dos aquênios de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	68,071	5	<0,001	4,067	5	<0,005
Extrato	14,963	2	<0,005	9,332	2	<0,005
Concentração*Extrato	4,270	10	<0,005	4,110	10	<0,005

G.L: grau de liberdade

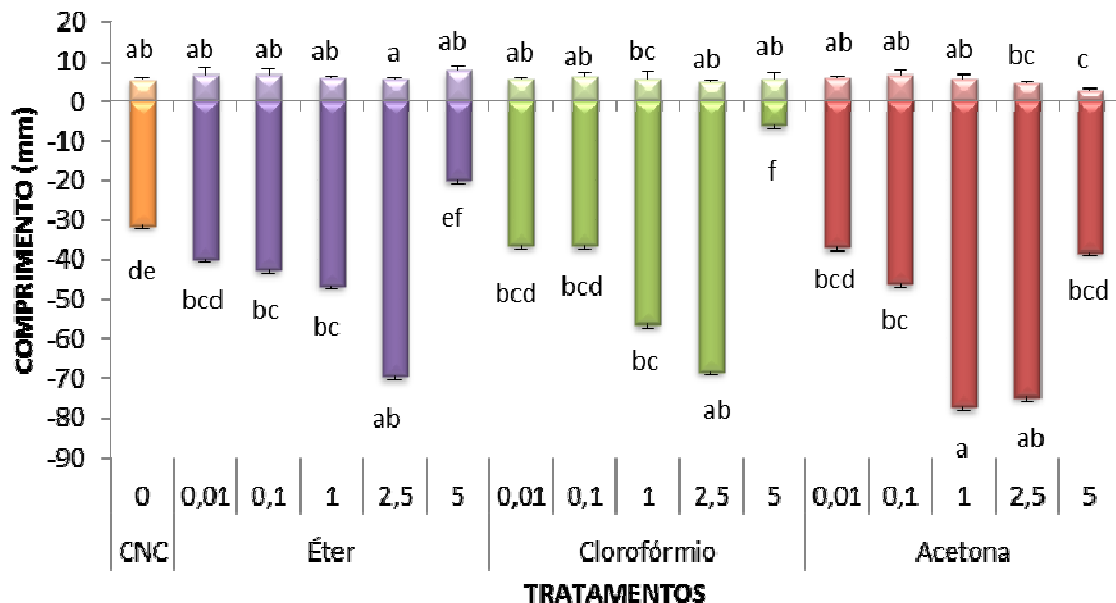


Figura 3. Valores médios do comprimento hipocotilar e radicular de plântulas de *Lactuca sativa* crescidas durante sete dias na presença de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar da concentração 0,01 mg/mL não ter sido significativa em relação ao controle, observaram-se alterações morfológicas ocasionadas pelos extratos, porém consideradas plântulas normais, segundo Brasil (1992). Nessa concentração, observou-se um espessamento da raiz primária causado pelo extrato clorofórmico e acetônico. Em 0,1 mg/mL o extrato clorofórmico promoveu o espessamento das raízes secundárias, o acetônico da raiz primária e o etéreo induziu a formação de raízes secundárias de aproximadamente 31 mm. A precocidade do surgimento das raízes laterais pode está relacionada a um desequilíbrio hormonal (deficiências de citocininas e altos níveis de auxina) causado por possíveis injúrias no ápice da raiz principal (Dayan *et al.*, 2000; Oliveira, 2003; Aloni *et al.*, 2006).

Quanto a concentração 1,0 mg/mL observou-se que o extrato clorofórmico produziu um espessamento da raiz primária. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato clorofórmico em baixa concentração induz a um maior investimento de matéria (nutrientes) para o espessamento dos órgãos da plântula, enquanto o extrato etéreo investe no alongamento das radículas. Espessamento de raízes também foi observado por Cruz-Ortega *et al.* (1998) e Chon *et al.* (2002). Segundo Jackson (1985) e Lorteau *et al.*, (2001) o aumento de diâmetro das raízes esta associado a formação endógena de etileno devido a algum tipo de estresse.

Para Pina (2008), a presença de aleloquímico no meio pode ser considerada um tipo de estresse.

Com exceção do extrato clorofórmico 0,01 mg/mL (redução de pêlos, limitados a base) e acetônico 1,0 mg/mL, todos os extratos inibiram a produção de pêlos e desenvolveram a formação de raízes secundárias. Esses resultados corroboram com os relatos de Kluthcouski (1982) e Putnam e Duke (1978), que afirmam que as substâncias aleloquímicas necessitam estar em uma concentração mínima no meio ambiente, para atuarem benéficamente sobre os organismos. Miró (1998), Oliveira *et al.* (2004), Jerônimo (2006), Aires (2007) e Pina (2008) também observaram em seus experimentos alterações morfológicas visíveis com reduções de pêlos radiculares, sendo tal redução considerada uma sensível indicação do efeito alelopático em bioensaios. De acordo com esses resultados, pode ser que as substâncias presentes nos extratos clorofórmicos e acetônicos ajam como inibidores de etileno, pois segundo Taiz e Zeiger (2004), plântulas crescidas na presença desses inibidores exibem uma redução na formação de pelos radiculares, sugerindo que esse hormônio atue como um regulador positivo na diferenciação dos pêlos.

Apesar de graficamente os resultados demonstrarem um acentuado estímulo no comprimento radicular causados por todos os extratos na concentração 2,5 mg/mL, somente o extrato clorofórmico (Fig. 4) promoveu a formação de plântulas normais intactas. Na figura 5 foi possível observar o estímulo e os danos causados pelo extrato acetônico nessa concentração em relação ao controle. Segundo Lima *et al.* (1990), as altas médias no comprimento de plântulas provavelmente são decorrentes do aumento da divisão celular. O extrato etéreo nessa mesma concentração (Fig. 4) induziu a formação de plântulas normais com pequenos defeitos (Tab. 4), como radículas muito finas, com pouco investimento nutricional, podendo ser que em condições naturais essas plântulas não se estabelecessem. O extrato acetônico, responsável pelas maiores estimulações, ocasionou o desenvolvimento de plântulas anormais, com raízes enoveladas. Em 5,0 mg/mL, todos os extratos levaram ao aparecimento de plântulas anormais (Tab. 4), o extrato clorofórmico e etéreo induziram a formação de radículas quase que inexistentes e necroses (dano físico, químico ou outra lesão externa que leve a morte celular segundo Taiz & Zeiger (2004) no ápice (Fig. 6). Resultados semelhantes no ápice radicular também foram observados por Pellissier (1993); Rodrigues, (2002), Maraschin-Silva & Aquila (2006). No extrato etéreo as maiores radículas eram muito finas e frágeis e no extrato clorofórmico ocorria a formação de raízes secundárias muito

pequenas e a mortalidade da maioria (aproximadamente 50%). Segundo Maraschin-Silva & Aquila (2006) o escurecimento e a fragilidade das raízes são danos que apontam a ação de substâncias tóxicas dos extratos. No extrato acetônico, graficamente pode-se observar que não houve diferença significativa em relação ao controle, pois nos primeiros dias do crescimento ocorreu escurecimento semelhante à necrose no ápice radicular, e dias após, nesse ápice, ocorreram o desenvolvimento de radículas muito finas e formação de raízes secundárias. Segundo Jerônimo (2006), devido à reversibilidade do crescimento, o escurecimento dos tecidos nesse caso não pode ser considerado necrose, podendo ser um provável acúmulo de fenóis. Desde o início da germinação, foi possível observar deformações e encurvamento da radícula nas plântulas submetidas à concentração 5,0 mg/mL. Reigosa *et al.*, (1999), explicam que essas diferenças causadas pelos extratos se dão porque cada processo fisiológico tem respostas diferentes a certas doses de cada aleloquímico em particular.

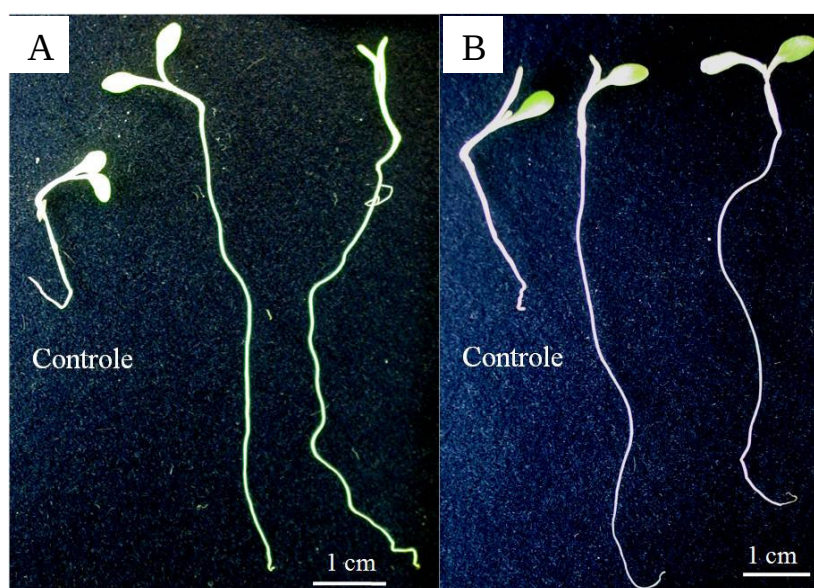


Figura 4. Plântulas de *Lactuca sativa* com estímulo do comprimento radicular induzido por extratos de *Cladonia verticillaris*, após sete dias de experimento. A. Tratamento com extrato etéreo 2,5 mg/mL; B. Tratamento com extrato clorofórmico 2,5 mg/mL.

Os efeitos visíveis causados por aleloquímicos são reflexos secundários de alterações que ocorrem em nível molecular (Rizvi & Rizvi, 1992). Cruz-Ortega *et al.*, (1998) relatam que o endurecimento e escurecimento dos ápices radiculares são evidências de alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por fitotoxinas. Alterações no crescimento e

diferenciação morfológica de plantas suscetíveis também foram relatadas por Chon *et al.*, (2002), com o uso de extratos de plantas de alfafa.

Cruz *et al.*, (2000) constataram que a forma de preparo, o método de aplicação e a concentração dos produtos são fatores decisivos na obtenção de resultados, pois os princípios bioativos são instáveis e não se distribuem de forma homogênea.

Tabela 4. Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de *Cladonia verticillaris* sob *Lactuca sativa* quando submetidas às doses crescentes dos extratos.

Concentrações (mg/mL)	Extrato etéreo	Extrato Clorofórmico	Extrato acetônico
0,0	Normal	Normal	Normal
0,01	Normal	Normal	Normal
0,1	Normal	Normal	Normal
1,0	Normal	Normal	Normal
2,5	Normal*	Normal	Anormal
5,0	Anormal	Anormal	Anormal

* Com pequenos defeitos, segundo Brasil (1992)

Na tabela 3 pode-se observar que a interação extrato/concentração foi significativa para o comprimento hipocotilar, demonstrando que os extratos não possuem o mesmo efeito em cada concentração. Evidenciou-se que o extrato acetônico 5,0 mg/mL inibiu 47,05% o alongamento hipocotilar das plântulas de *L. sativa* e o extrato etéreo aumentou 40,04% em relação ao controle, havendo uma diferença de 164,4 % entre esses dois tratamentos quando analisados sobre a mesma concentração. Todos os extratos na concentração 5,0 mg/mL induziram a formação de hipocótilo enrolado, caracterizando-se as plântulas como anormais (Tab 4).

Apesar de ser um resultado pouco freqüente, existe trabalho que relate estímulo no crescimento de *L. sativa*, mas explicações detalhadas sobre esse efeito ainda são escassas. Entre essas explicações pode-se sugerir uma interferência dos aleloquímicos agindo como fitorreguladores (Aquila *et al.*, 1999). Em estudos semelhantes Bradow & Connick (1987) observaram estímulo na germinação de *A. cepa* pelos extratos da parte aérea e raiz de *Amaranthus palmeri*; entretanto, o extrato da parte aérea causou inibição na germinação da própria espécie e não afetou a germinação de *Daucus carota*, mostrando que os aleloquímicos

atuam por diferentes mecanismos nas espécies ensaiadas. Muller *et al.* (2007) observaram que o crescimento do coleóptilo de cebola, quando ensaiado pelo extrato etanólico bruto de *Gleichenella pectinata* era estimulado significativamente na concentração de 500mg.L⁻¹. Existem também relatos das substâncias liquênicas estimulando o desenvolvimento de plantas (Ibi *et al.*, 1979; Quilhot *et al.*, 1981). Yano (1994) notou que dependendo da concentração, os extratos de *C. verticillaris* promoviam o crescimento radicular e hipocotilar de *Allium cepa*. Essas diferenças no grau de inibição ou estímulo de um aleloquímico dependem da espécie estudada, do tempo de exposição dos compostos e de sua concentração (Bradow & Connick, 1988).

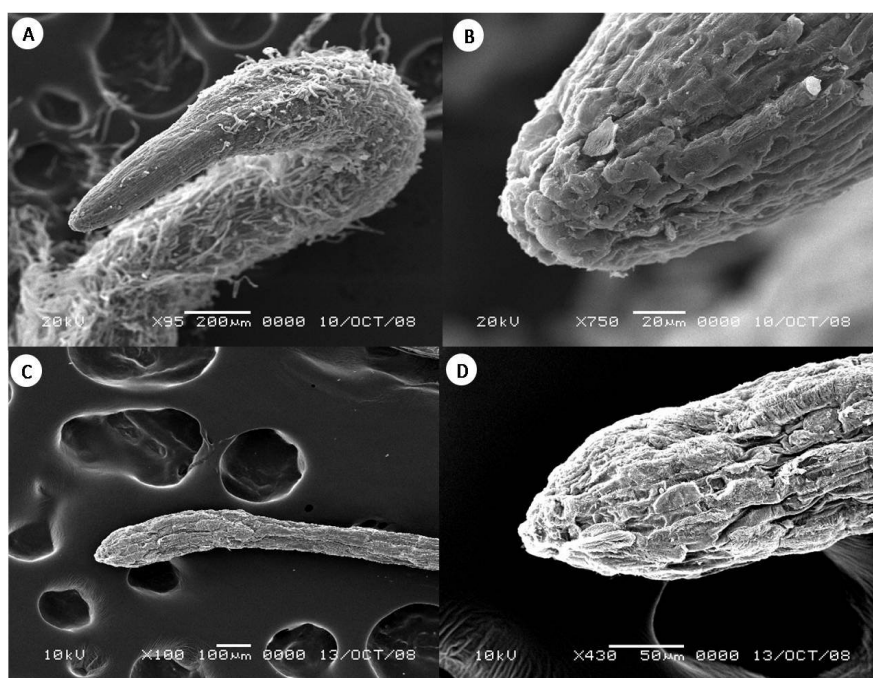


Figura 5. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das raízes de *Lactuca sativa*, submetidas a extratos de *Cladonia verticillaris* com 4 dias de germinação. **A.** Controle com visualização do ápice radicular e zona pilífera. **B.** Ápice radicular do controle. **C - D.** Alterações micromorfológicas induzidas pelo extrato acetônico 2,5 mg/mL. **C.** Ausência de pêlos, raiz comprida e delgada. **D.** Células apicais deterioradas em relação ao controle (B).

Em bioensaios desta natureza, percebe-se que, comparada à parte aérea das plântulas, a absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas ou fitorreguladores nos tecidos radiculares é favorecida, isto devido ao contato físico da radícula com o papel-filtro, o que a expôs diretamente ao extrato. A capacidade de translocação do aleloquímico da raiz para a

parte aérea e o mecanismo de ação do mesmo também devem ser considerados. O sítio de ação do fitoquímico pode não estar relacionado à inibição da divisão celular do eixo embrionário, resultando na ausência de efeito sobre a germinação de sementes. Desta forma, a bioatividade de extratos estaria condicionada à capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação dos seus compostos potencialmente alelopáticos (Correia *et al.*, 2005).



Figura 6. Toxicidade das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos extratos de *C. verticillaris*. **A.** Controle com três dias, presença de pêlos; **B.** Raízes encurvadas do tratamento acetônico 5,0 mg/mL com três dias; **C.** Radícula oxidada e hipocótilo encurvando-se no tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL; **D e E.** Anormalidade das plântulas no tratamento acetônico 5,0 mg/mL com sete dias; **F.** Estrangulamento da radícula e desenvolvimento de radícula longa e muito fina no tratamento 2,5 mg/mL; **G.** Necrose radicular no tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL; **H.** Necrose na raiz primária e na secundária no tratamento etéreo 5,0 mg/mL; **I.** Detalhe da necrose apical do tratamento 5,0 mg/mL do extrato etéreo.

Sensibilidade diferencial aos inibidores tem sido relatada em vários outros estudos (Halligan, 1976, Barnes & Putnam, 1987, Duke *et al.*, 1987, Fischer *et al.*, 1989, Peterson & Harrison, 1991). Em muitos deles, o que se observa é um efeito alelopático mais pronunciado sobre o desenvolvimento inicial de uma plântula alvo quando comparado à germinação, já que este último processo utiliza reservas da própria semente (Miró *et al.*, 1998; Jacobi & Ferreira, 1991; Aquila, 2000). Essa dependência das reservas poderia fazer com que a germinação fosse menos suscetível a fatores exógenos, bem como a possibilidade de que durante o processo que as sementes foram embebidas, muitos aleloquímicos ficaram retidos pelos tegumentos protetores do embrião, não chegando até eles em concentrações significativas a ponto de interferir na sua expansão (Pina, 2008).

Com relação ao comprimento foliar, observou-se que a interação extrato/ concentração foi significativa (Tab. 5). Os extratos acetônicos 0,1 mg/mL (46,91%) e 0,01 mg/mL (44,44%) e clorofórmicos nessas mesmas concentrações (45,19% e 36,04%), proporcionaram um aumento do crescimento foliar. O extrato acetônico 2,5 mg/mL inibiu 36,54% o crescimento em relação ao controle. A diferença do maior estímulo ao ponto de maior inibição foi de 56,8%.

Quanto à largura foliar observou-se diferença significativa para variável concentração (Tab. 5). O extrato acetônico 2,5 mg/mL e etéreo 5,0 mg/mL reduziram a largura foliar. Entretanto, o extrato clorofórmico 0,1 mg/mL e acetônico 0,01 mg/mL, proporcionaram aumento da largura foliar. Nesse experimento evidenciou-se uma diferença de 23,74% entre o ponto de maior estímulo e de menor inibição. A concentração 2,5 mg/mL produziu efeitos distintos, onde o extrato acetônico teve efeito inibitório e o clorofórmico efeito estimulador. Na figura 7, ao analisar o parâmetro área foliar, observou-se efeito inibidor causado pelo extrato acetônico e etéreo a 2,5 mg/mL (44,15% e 27,87%) e acetônico a 5,0 mg/mL (17,03%) e, uma indução do aumento ocasionada pelo extrato clorofórmico a 0,1 mg/mL (66,69%). A diferença do ponto de maior inibição ao ponto de maior estímulo foi de 198,5%. Esse experimento reproduz os efeitos observados na análise de comprimento e largura foliar. Essas análises são importantes para verificação do potencial alelopático e as possíveis vias afetadas pelos extratos, ou seja, onde eles investem suas substâncias e como ocorre esse investimento. Assim, através de um maior número de análises, é possível melhor caracterizar as substâncias potencialmente alelopáticas. Pois, como o extrato clorofórmico a 0,1 mg/mL

não produziu efeitos significativos no alongamento do eixo hipocótilo-radícula, sem a mão da análise foliar poder-se-ia inferir um falso resultado da não influência alelopática desse extrato. Quanto às análises foliares (Tab. 5), pode-se observar que o parâmetro comprimento foi mais significativo que a largura e área foliar.

Tabela 5. Resultado da análise de variância do comprimento, largura e área foliar das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	COMPRIMENTO FOLIAR			LARGURA FOLIAR			ÁREA FOLIAR		
	F	G.L	p	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	34,760	5	<0,001	5,59	5	<0,005	16,941	5	<0,001
Extrato	3,907	2	<0,005	2,80	2	0,069	1,287	2	0,2844
Concentração * Extrato	3,864	10	<0,005	1,66	10	0,114	2,394	10	<0,005

L.G: grau de liberdade

Ao se comparar todas as análises dos parâmetros biométricos, pode-se observar que o extrato acetônico 2,5 mg/mL induziu o desenvolvimento de plântulas anormais, porém com um elevado crescimento radicular e um baixo investimento de nutriente para o desenvolvimento foliar. Os extratos clorofórmicos 0,01 e 0,1 mg/mL e acetônico 0,01 mg/mL levaram a um desenvolvimento acelerado dos eófilos e o extrato clorofórmico 0,1 mg/mL proporcionou o espessamento foliar das plântulas de *L. sativa*.

Souto *et al.* (1994) verificaram que restos de *Pinus radiata* D. Don e *Eucalyptus lobulus* Labill, inibiam o crescimento e desenvolvimento da alface e o efeito alelopático era devido principalmente a compostos fenólicos. Resultados semelhantes sobre a redução do crescimento de plântulas de *L. sativa* também foram obtidos por Kim & Kil (2001) ao analisar compostos voláteis de plantas de tomate.

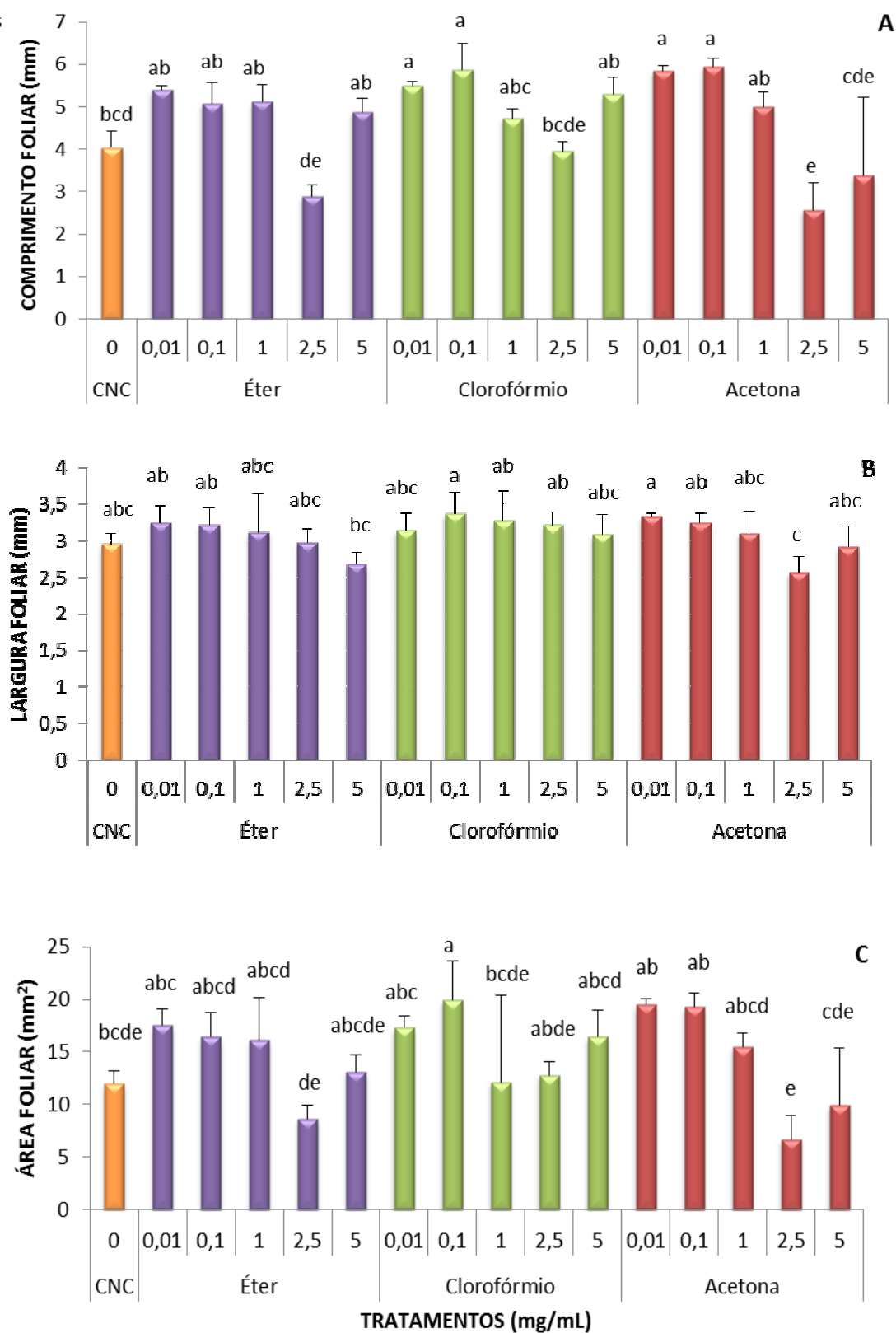


Figura 7. Valores médios do comprimento (A), da largura foliar (B) e da área foliar (C) de plântulas de *Lactuca sativa* crescidas durante sete dias na presença de diferentes extratos de

Cladonia verticillaris em cinco concentrações, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Através dos *spots* detectados através da UV/VIS e valores de Rf na CCD, foi possível visualizar a presença do FUM e PRO somente no extrato acetônico (Fig. 7). Contudo, as análises em CLAE indicaram a presença de PRO no extrato etéreo, FUM no extrato clorofórmico e ambos os compostos no extrato acetônico. Na tabela 6 pode-se observar que o extrato etéreo e clorofórmico apresentaram baixas concentrações dos seus respectivos compostos, sendo uma provável justificativa para sua ausência na CCD. Segundo Geyer & Feige (1987), substâncias em baixas concentrações são metabólitos biogeneticamente relacionados. Quanto ao extrato acetônico, foi possível observar uma alta concentração de FUM (Figura 8), e também concentrações traço de PRO, sendo sua presença justificável, uma vez que este composto é produzido a partir da hidrólise do FUM (Huovinen *et al.*, 1983). Este resultado juntamente com a CCD corrobora com os relatos de Asahina & Shibata (1954) que destacam a acetona como bom solvente extrator de compostos liquênicos, pela sua capacidade de retirar as substâncias tanto ao nível cortical como medular, sendo este solvente rotineiramente empregado na extração, no isolamento e na purificação dos compostos liquênicos (Vicente, 1975).

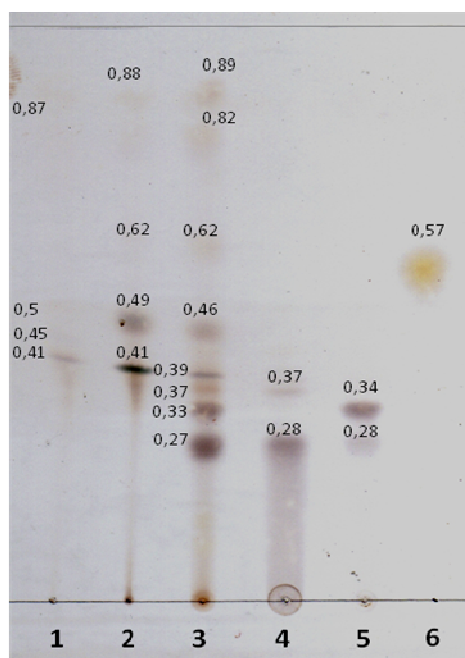


Figura 8. CCD dos extratos e padrões de *Cladonia verticillaris*. 1. Extrato etéreo. 2. Extrato clorofórmico. 3. Extrato acetônico. 4. PRO. 5. FUM. 6. ATR.

É possível que os compostos detectados por CLAE sejam os responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados, ou ainda que estes, dependendo da sua concentração estejam agindo em sinergismo com as substâncias observadas na CCD ou com compostos não detectados pelas técnicas realizadas. Einhellig & Rasmussen (1979) expõem que a quantidade aparentemente insignificante dos fenólicos individualmente chega a ser relevante quando demonstram sua atividade sinérgica. E, segundo Inderjit, (1996), os extratos usados nos bioensaios para diagnóstico preliminar de alelopatia são misturas de várias substâncias, que podem exercer efeitos aditivos ou sinérgicos, tornando importante a análise da ação de cada substância isoladamente.

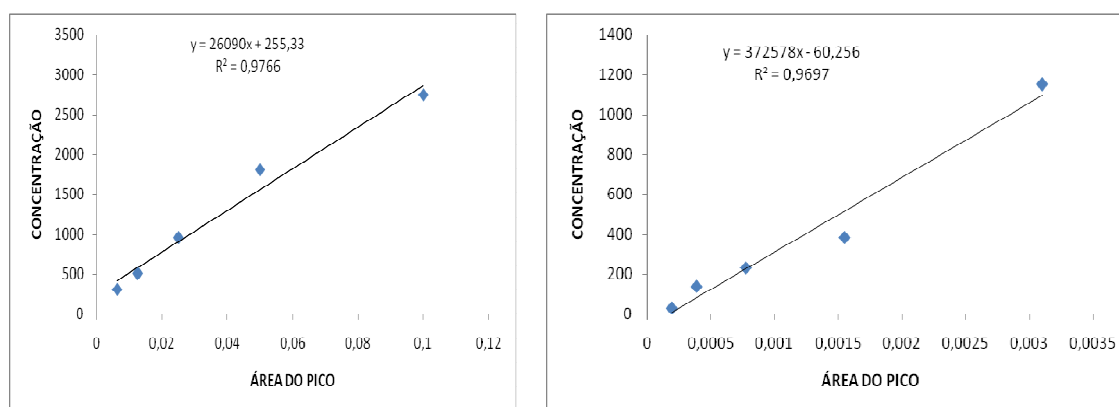


Figura 9. Curva de calibração para quantificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) a esquerda e do ácido protocetrárico (PRO) a direita.

Tabela 6. Resultado das análises dos extratos de *Cladonia verticillaris* a uma concentração de 1 mg/mL submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência.

EXTRATO	Tempo de Retenção (min)	Área do pico	Concentração (µg/mL)	Composto
Metanol (Controle)	2,7464	13,014	-	Solvente
	2,8075	7,628		
Etéreo	3,8741	53,516	0,305	PRO
Clorofórmico	4,720	187,444	2,601	FUM
Acetônico	2,7259	12,043	-	Solvente
	2,7873	9,773		
	3,9472	23,416	0,250	PRO
	4,0041	9,503		
	4,2073	126,105	7,062	FUM
	4,3763	44,952		

Lawrey (1977) utilizando substâncias puras e extratos acetônicos de várias espécies de *Cladonia* para três espécies de musgos, observou inibição completa da germinação e crescimento dos esporos dos musgos e que a toxicidade dependia da concentração e do pH. Na tabela 7 encontram-se os pHs dos extratos de *C. verticillaris*, os quais estão fora dos limites prejudiciais à germinação e ao desenvolvimento de plântulas, confirmando observações descritas na literatura (Everitt *et al.*, 1983; Eberlein, 1987; Pattnaik & Misra, 1987; Sousa Filho *et al.*, 1996). Baskin & Baskin (1998) relatam que *L. sativa* apresenta uma ampla faixa de pH para germinação, com valores entre 3,0 e 7,0.

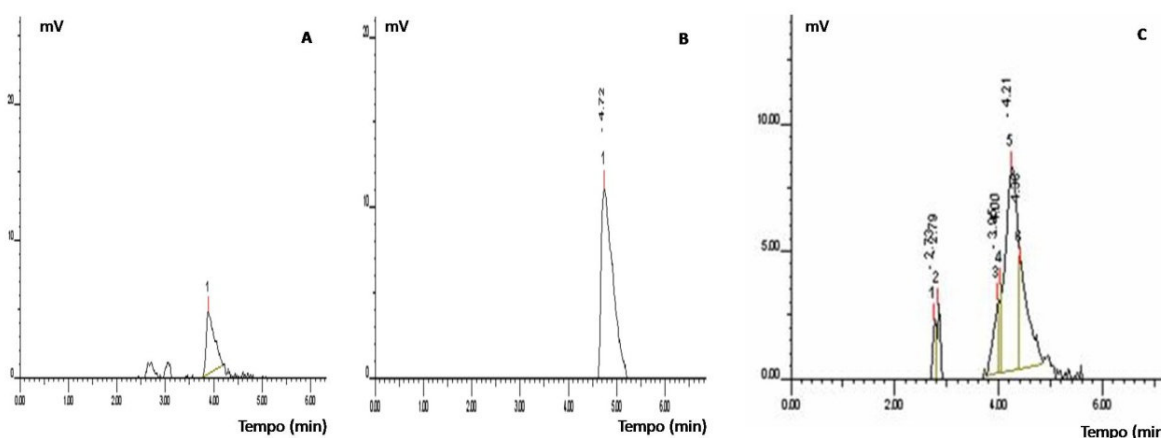


Figura 10. Cromatogramas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos de *Cladonia verticillaris* a uma concentração de 1 mg/mL. **A.** Extrato etéreo. **B.** Extrato clorofórmico. **C.** Extrato acetônico.

Tabela 7. Características dos pHs médios dos extratos de *Cladonia verticillaris* a uma concentração de 5 mg/mL

EXTRATOS	pH
Etéreo	5,0
Clorofórmico	5,5
Acetônico	6,0

Segundo Muller *et al.* (2007), o conhecimento dos aleloquímicos pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias na pesquisa de modelos de herbicidas naturais mais específicos e menos prejudiciais ao meio ambiente do que os herbicidas sintéticos aplicados

atualmente nas culturas. Assim, teoricamente, os extratos de *C. verticillaris* podem ser usados como bioherbicidas em programas de biocontrole de pragas, no entanto é necessário explorar suas vias de atuação (Duke *et al.*, 2002).

Agradecimentos

À CAPES pela bolsa de Mestrado concedida. Ao CNPq pela bolsa de Produtividade em Pesquisa de E. C. Pereira

Referências bibliográficas

- Aires. 2007. **Potencial alelopático de espécies nativas do Cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras**. 81p. Tese (Mestrado). Universidade de Brasília.
- Aloni, R.; Aloni E.; Langhans, M.; Ullrich, CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany** **97**: 883-893.
- Asahina, Y. Chemsus der Claonien unter besonderer Berucksichtigung der japanischen Arten (Fortsetzung). 1943. **Journal of Japanese Botany** **49**: 227-244.
- Aquila, M.E.A.; Ungaretti, J.A.C.; Michelin, A. 1999. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achryrocline satureioides* (Lam) DC. **Acta Horticulturae** **502**: 383-387.
- Aqüila, M. E. A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia** **53**: 51-66.
- Barnes, J. P.; A. Putnam. 1987. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Chemical Ecology** **13**: 889-905.
- Baskin, C.C.; Baskin, J.M. 1998. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. New York: Academic Press, 666 p.
- Benicasa, M.M.P. 1988. **Análise de crescimento da plantas**. FUNEP, Jaboticabal.
- Bewley, J.D., Black, M., 1978. **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination**. Springer-Verlag, New York, vol. 1.

- Bradow, J. M.; Connick, W.J., Jr. 1987. Allelochemicals from palmer amaranth, *Amaranthus palmeri* S. Wats. **Journal of Chemical Ecology** **13**: 185-202.
- Bradow, J. M.; Connick, W.J., Jr. 1988. Seed germination inhibition by volatile alcohols and other compounds associated with *Amaranthus palmeri* residues. **Journal of Chemical Ecology** **14**: 1633- 1648.
- Brasil. 1992. **Regras para análise de sementes**. SNDA/DNDV/CLAV, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L.; Takaki, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica** **21** (3): 697-705.
- Campos, J.M.S.; Davide, L.C.; Soares, G. L. G.; Viccini L.F. 2008. Mitodepressive and clastogenic effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology** **31** (1): 141-145.
- Chon S.U., Choi S.K., Chung S., Jang H.G., Pyo B.S., Kim S.M. 2002. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass, **Crop Protection** **21**: 1077–1082.
- Correia, N.M.; Centurion, M.A.P. C.; Alves, P.L.C.A. 2005. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural** **35** (3): 498-503.
- Cruz, S.E.M.; Nozaki, M.H.; Batista, M.A. 2000. Plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** **15**: 28-34.
- Cruz-Ortega, R.; Anaya, A.L.; Hernández, B.E.; Laguna, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology** **24**: 2039-2057.
- Culberson, C. F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatography method. **Journal of Chromatography** **72**: 113-125.
- Dauriac, H.; Rondon, Y. 1976. Quelques aspects des propriétés d'un lichen, ie *Letharia vuipina*, em biologie végétale expérimentale. I. Action sur la germination Du bié et Le development de l'all. **Bulletin de la Société botanique de France** **123**: 235-241.
- Dayan, F. E.; Watson, S. B.; Galindo, J. C. G.; Hernández, A.; Dou, J.; Mcchesney, J. D. ; Duke, S. O. 1999. Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements. **Pesticide Biochemistry and Physiology** **65**: 15–24.

- Dayan F.E., Romagni J.G., Duke S.O. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology** **26**: 2079-2094.
- Duke, S. O., K. C. Vaughn, E. M. Croom, Jr., and H. N. Elsohly. 1987. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. **Weed Science** **35**: 499-505.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M.; Schrader, K.K.; Aliotta, Q.; Oliva, A.; Romagni J.G. 2002. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science** **50**: 138–151.
- Eberlein, C.V. 1987. Germination of *Sorghum almun* seeds and longevity in soil. **Weed Science** **35**: 796-801.
- Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology** **5**: 815-24.
- Everitt, J.H. et al. 1983. Seed germination characteristics of *Kochia scoparia*. **Journal Range Management** **36** (5) : 646-648.
- Ferreira, A.G.; Aquila, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **12**: 175-204.
- Fischer, N.H.; Weidenhamer, J.D.; Bradow, J.M. 1989. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. **Journal of Chemical Ecology** **15**: 1785-1 793.
- Follmann, G.; Nakagawa, W. 1963. Keinhmmung von reindeer-moss (*Cladonia*) on jack pine and whit spruce. **Die Naturwissenschaften**, **22**: 696-697.
- Gatti, A.B.; Perez, S.C.J.G.A.; Lima, M.I.S. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica** **18**: 459-472.
- Geyer, M.; Feige, G.B. 1987. Analysis of depsides, depsidonas, and other lichen specific aromatics by high performance liquid chromatography. **Bibliotheca Lichenologica** **25**: 467-468.
- Halligan, J.P. 1976. Toxicity of *Artemisia californica* to four associated herb species. **American Midland Naturalist** **95**:406-421.
- Han, D.; Matsumaru, K.; Rettori, D.; Kaplowitz, N. 2004. Usnic acidinduced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology** **67**: 439–451.
- Huovinen, K.; Hiltunen, R.; Scantz, M. 1983. Analysis of lichen acids from extracts of *Cetraria islandica* by high performance liquid chromatography. Gesamtkongress der pharmazeutischen Wissenschaften Die in der Arzneimitielforschung. **Abstracts**, p. 294.

- Ibi, A.; Tanniguchi, E.; Maekawa, K. 1979. Syntheses and biological activities of tetronic substances in the genus *Cladonia*. **Annales Botanici Fennici** **23**: 173-188.
- Inderjit. 1996. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review** **62**: 186-202.
- Jackson, M.B. 1985. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology** **36**: 145-174.
- Jacobi, U.S.; Ferreira, A.G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimacronata* (DC) DC. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **26** (7): 935-943.
- Jerônimo, 2006. **Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília.
- Kim, Y.S.; Kil, B.S. 2001. Allelopathic effects of some volatile substances from the tomato plant. pp.313. In: R.K. Kohli, H.P. Singh & D.R. Batish (Editors), **Allelopathy in Agroecosystems**. New York: Food Products Press.
- Kluthcouski, J. 1982. ***Leucaena*: alternativa para pequena e média agricultura**. Goiânia : Embrapa-CNPAP, 12p. (Embrapa-CNPAP. Circular Técnica, 6).
- Labouriau, L.G. 1983. **A germinação de sementes**. OEA, Washington, DC.
- Latkowska, E., Lechowski, Z., Białczyk, J.; Pilarski, J. 2006. Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (+)-usnic acid. **Journal of Chemical Ecology** **32**: 2053–2066.
- Inderjit. 1996. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review** **62**: 186-202.
- Lechowski, Z.; Mej, E.; Białczyk, J. 2006. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. **Environmental and Experimental Botany** **56**: 239-244.
- Legaz, M.E.; Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiology** **71**: 300-302.
- Lima, R.M.C.; Nascimento, S.C.; Pereira, E.C.P.; Campos-Taki, G.M. 1990. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. **Boletim da Sociedade Broteriana** **63** (24): 339-348.
- Lorteau, M.A. ; Ferguson, B.J. ; Guinel, F.C. 2001. Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. **Physiologia Plantarum** **112**: 421-428.

- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. **Crop Science** 2 : 176-177.
- Maraschin-Silva, F.; Aquila, M.E.A. 2006. Potencial Alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica** 20 (1): 61-69.
- Miró, C.P.; Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33: 1261-1270.
- Muller, C.; Chagas, F.F; Peres, M.T.L.P.; Hess, S.C.; Faccenda, O.; Daloso, D.M. 2007. Potencial Fitotóxico de Algumas Espécies Gleicheniaceae sobre *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências** 5 (2): 45-47.
- Neves, R. 2005. **Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja.** 87p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.
- Oliveira, S.C.C. 2003. **Alelopatia em *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae).** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 78pp.
- Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2004. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit on sesame seed germination and seedling growth. **Allelopathy Journal** 13 (2):201-210.
- Pattanaik, S.K.; Misra, N.K. 1987. Morphology and germination characteristics of *Aristida* seeds. **Acta Botanica Hungarica** 33 (3/4): 413-420.
- Pellissier, F. 1993. Allelopathic inhibition of spruce germination. **Acta Oecologica** 14 (2): 211-218.
- Periotto, F. 2003. **Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth. e de *Anacardium humile* Mart. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e de *Raphanus sativus* L.** 52p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Peterson, J. K.; H. F. Harrison, Jr. 1991. Differential inhibition of seed germination by sweetpotato (*Zpomoea batatas*) root periderm extracts. **Weed Science** 39: 119-123.
- Pina, G. O. 2008. **Efeitos Alelopáticos de *Eugenia dysenterica* Dc (Myrtaceae) sobre a germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae - gergelim), e *Raphanus sativus* (Brassicaceae - rabanete).** Dissertação (Mestrado em Botânica).
- Prates, H.T.; Paes, J.M.V.; Pires, N.M.; Filho, I.A.P.; Magalhães, P.C. 2000. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35 (5): 909-914.

- Putnam, A.R.; Duke, W.B. 1978. Allelopathy in agrossistems. **Annual Review of Phytopathology** 16: 43-451.
- Quilhot, W., Thompson, W. J.; Vidal, B.S.; Campos, P.G. 1981. Lichen substances and the plant growth. I. The effect of rocellic acid on development of adventitious roots in cuttings of *Tradescantia virginiana*. **Journal of Hattori Botanical Laboratory** 49: p. 273-277.
- Reigosa, M.J.; Sanchez-Moreiras, A. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** 18: 877-608.
- Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. 1992. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. Pp. p. 443-472. In: Rizvi, S.J.H.; Rizvi, H. (Eds.) **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall.
- Rodrigues, K.C.S. 2002. **Verificação da atividade alelopática de *Myrciaria cuspidata* Berg. (Camboim)**. 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Romagni, J.G.; F.E. Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Pp. 13-33. In: Macias, F.A. (Ed.). **Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites**. In **allelopathy**. CRC press LLC, Boca Raton, Fla.
- Rondon. Y. 1966. Action inhibitrice de l'extrait du lichen *Roccellnijiicoides* (Dicks.) Vain. sur la germination. **Bulletin Société Botanique de France** 113: 1-2.
- Santos, P.S. dos; Abreu, A. de F.B. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas**. 2000. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/publicacoes/revista/semi00s/paulosergio.htm>>. Acesso em: 15 maio 2001.
- Silva, J.B.; Nakagawa, J. 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates** 5: 62-73.
- Sedia, K.G.; **Ehrenfeld, J.G.** 2003. Lichens and mosses in the New Jersey Pinelands and the genesis of alternate stable states in the vascular plant community. **Oikos** 100: 447-458.
- Souto, X. C.; Gonzalez, L.; Reigosa, M. J. 1994. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four foresty species during decomposition process in their soils in Galicia (NW. Spain). **Journal of Chemical Ecology** 20 (11): 3005-3015.
- Souza Filho, A. P. S.; Rodrigues, L. R. A.; Rodrigues, T. J. D. 1996. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta Daninha** 14 (2): 93-101.
- Souza Filho, A.P.S.; Alves, S.M. 2000. Potencial alelopático de plantas de acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha** 18 (3): 435-441.

- Souza Filho, A.P.S., Fonseca, M.L.; Arruda, M.S.P. 2005. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha** **23**: 565-573.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Trad. Eliana Rebonato Santarém et al., Porto Alegre: Artmed editora, 719 p.
- Tukey Junior, H.B. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Botanical Review** **35**: 1-16.
- Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las substancias liquênicos**. 1. Ed. Madrid. Alhandra S.A., 162p
- Yano, A. M. 1994. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula *Allium cepa***. 126f. Dissertação. Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.
- Wu, H.; Pratley, J.; Lemerle, D. Haig, 1999. T. Crop cultivars with allelopathic capability. **Weed Research** **39**: 171–180.

Capítulo 2

Potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

Potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

Rafaela Carvalho Tigre^{1*}, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira², Nicácio Henrique da Silva³, Mauro Guida dos Santos⁴

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: biotigre@gmail.com. ²Departamento de Ciências Geográficas; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: eugenia.pereira@pq.cnpq.br. ³Departamento de Bioquímica - Laboratório de Produtos Naturais; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: nhsilva@uol.com.br. ⁴Departamento de Botânica - Laboratório de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: mauroguida@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos de alelopatia investigam os efeitos positivos e negativos que metabólitos secundários de plantas, microrganismos ou fungos exercem sobre o desenvolvimento de indivíduos vizinhos. Nesse trabalho foram investigados os efeitos de extratos orgânicos de *C. verticillaris* no desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea, de plântulas de *L. sativa*. Os extratos foram obtidos em soxhlet com solvente éter, clorofórmio e acetona. Estes causaram inibição e estímulo do desenvolvimento do eixo hipocótilo-radícula que variaram de acordo com a concentração. O comprimento foliar foi reduzido significativamente em relação ao controle e a largura e área foliar não foram afetadas pelos extratos testados. O extrato clorofórmico 0,1 e 5,0 mg/mL reduziram a biomassa das plântulas. Nas análises químicas foi detectada a presença do ácido fumarprotocetrárico e protocetrárico. Metabólitos secundários de *C. verticillaris* causaram alterações metabólicas e morfológicas nas plantas de *L. sativa*, que podem estar relacionadas à presença desses compostos sendo possível que este líquen desencadeie efeitos similares sobre outras espécies vegetais na sua vizinhança.

Palavras-chave: alelopatia, ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico

ABSTRACT

Allelopathic studies investigate the positive and negative effects of secondary metabolites of plants, microorganisms and fungi on the development of neighboring individuals. In this work, the allelopathic effects of organic extracts of C. verticillaris (lichen) in the development of the root system and of the aerial part, of seedlings of L. sativa. The extracts were obtained in a Soxhlet apparatus with diethyl ether, chloroform and acetone. The test material caused inhibition and stimulation on development of the hypocotyl and root, in accordance with the concentration increasing. The leaf length was reduced significantly regarding to the control. The width and leaf area were not affected by the tested extracts. The chloroform extract (0,1 and 5,0 mg/mL) reduced the dry weight of the seedlings. In chemical bioassays were detected the presence of the fumarprotocetraric and protocetraric acids. Secondary metabolites of C. verticillaris caused metabolic and morphological alterations in the plants of L. sativa.

Key words: Allelopathy, fumarprotocetraric acid, protocetraric acid

*Autor para correspondência

INTRODUÇÃO

A competição que as plantas invasoras exercem sobre as cultivadas é um dos grandes problemas que afetam a produção agropecuária. Os métodos usados para combater esses problemas são embasados principalmente no uso de compostos químicos que são em geral prejudiciais ao meio ambiente devido à contaminação das águas e do solo. Diante disso, tem-se um grande interesse no âmbito científico nacional e internacional em determinar quais os metabólitos que podem e têm a capacidade de alterar o desenvolvimento de outras espécies (Krautmann *et al.*, 2000).

Compostos alelopáticos são agentes químicos produzidos por um determinado organismo, que afeta a saúde, o crescimento, comportamento, biologia populacional ou de organismos de outras espécies (Engel & Pawlik, 2000). Recentes estudos têm demonstrado que os extratos vegetais e seus componentes podem afetar o ciclo de vida de alguns insetos, e esses mesmos extratos também podem interferir com a germinação de sementes de algumas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Liu *et al.*, 2002; Tawaha & Turk, 2003; Koul, 2004; Nasir *et al.* 2005; Dias *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2007).

Certamente, nenhuma área de investigação dentro da biologia vegetal tem provocado tanta controvérsia quanto a ciência da alelopatia (Romeo & Weidenhamer, 1998). As investigações científicas em alelopatia têm se concentrado principalmente nas interações entre espécies vegetais cultivadas e na prospecção de novas moléculas com propriedades herbicidas.

Muitos compostos liquênicos apresentam potencial alelopático, agindo como moléculas mensageiras sobre o desenvolvimento não somente de outros líquens, mas também sobre outras espécies. Apesar do conhecimento e das demonstrações da eficiência desses compostos, as interações alelopáticas em ecossistemas não são ainda bem compreendidas. Muitos desses aleloquímicos, que se encontram em sistemas vivos ou resíduos, geralmente são lixiviados em quantidades significativas pela chuva e orvalho para o solo.

Segundo Ascaso & Rapsch (1985), rizinas de líquens podem de maneiras diferentes penetrar nos tecidos vegetais e sistemas vasculares e Bouaid e Vicent (1998) relatam que dessa forma, substâncias como o ácido úsnico, pode ser distribuído diretamente por toda planta. Há evidências de que alguns compostos liquênicos possuem efeitos alelopáticos, como o ácido úsnico, mas pouco é conhecido sobre seu modo de ação. Efeitos fitotóxicos desse composto sobre alguns processos fisiológicos nas plantas têm sido descritos por vários autores (Or'us *et al.*, 1981; Nishitoba *et al.*, 1987), como a inibição de algumas enzimas tais como urease, arginase (Proksa *et al.*, 1996) e p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (Romagni *et al.*, 2000). Esse composto também é relatado como antimitótico em diferentes sistemas biológicos (Huovinen & Lampero, 1989; Cardarelli *et al.*, 1997).

Todavia, dentro do conjunto dos conhecimentos atuais acerca das espécies com potencialidades alelopáticas, existe ainda uma lacuna no que tange aos efeitos das substâncias alelopáticas sobre o metabolismo das espécies alvo (Reigosa *et al.*, 1999; Mizutani, 1999; Inderjit & Duke 2003). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi detectar as interferências alelopáticas dos extratos de *C. verticillaris* no desenvolvimento inicial de *L. sativa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos extratos

Cladonia verticillaris, espécie ocorrente no litoral brasileiro e tabuleiros de interior do Nordeste, foi coletada na Serra da Prata no município de Saloá, 273 km do Recife. Este material foi seco à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), triturado e posteriormente realizadas extrações dos seus compostos em um soxhlet com éter, clorofórmio e acetona, de acordo com a série eluotrópica. Os extratos foram evaporados, e seus resíduos foram pesados e mantidos em dessecador até estabilização do peso. Para os ensaios alelopáticos, os extratos foram ressuspensos e preparadas soluções nas concentrações de 0,02; 0,2; 2,0; 5,0 e 10,0 mg/mL. Parte do material foi registrada no Herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco, nº 52.299.

Análises químicas

Foram realizadas medidas de pH de todos os extratos. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merck, posteriormente desenvolvidas no sistema de solventes B (hexano/ éter dietílico/ ácido fórmico, 130:80:20, v/v) (Culberson, 1972). Após evaporação dos solventes, as placas foram reveladas sob luz UV curta e longa, e posteriormente pulverizadas com ácido sulfúrico a 10% e aquecidas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em cromatógrafo líquido HITACHI, acoplado a detector de ultravioleta a 254 nm, em coluna de fase reversa C18. A fase móvel constituiu-se por metanol/água/ácido acético (80:19, 5; 0,5 v/v), sob um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, atenuação 0,04 e temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) segundo metodologia de Legaz & Vicente (1983). As amostras (extrato etéreo, clorofórmico e acetônico) foram injetadas em concentrações de 0,01 mg/mL em seus respectivos solventes. Foram realizadas curvas de calibração para os padrões dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO).

Os cromatogramas foram interpretados de acordo com o tempo de retenção das substâncias e da área do pico, cujos valores foram aplicados às equações para determinar as concentrações de FUM e PRO nas amostras.

Bioensaio de crescimento

Os bioensaios foram realizados em placas de Petri, forradas com duas folhas de papel-filtro, previamente autoclavadas a 120°C por 40 min. Em cada placa foram colocados 3 mL das soluções mencionadas anteriormente. Essas placas foram levadas abertas ao fluxo laminar por 12 h para total eliminação dos solventes. Posteriormente, foram adicionadas em cada placa 6 mL de água destilada obtendo-se concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL, mais o controle (água destilada). Em cada placa foram colocadas 10 plântulas de *Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids, pré-germinadas em água destilada por 48 h. Essas placas foram vedadas e incubadas em uma B.O.D a 25°C em fotoperíodo de 12 h, por 10 dias. Decorrido este período, foram medidos o eixo hipocótilo-radícula e área foliar (comprimento X largura). Essas plântulas também foram caracterizadas quanto anormais e normais segundo Brasil (1992) e calculado o peso seco de cada tratamento. Foram utilizadas quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Análise estatística

Os dados se processaram mediante análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$) para confrontação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos etéreos e clorofórmicos de *C. verticillaris* tiveram efeitos significativos sobre o comprimento radicular em relação ao controle (Tab. 1 e Fig. 1A).

Todos os extratos promoveram aumento do crescimento radicular de *L. sativa* até a concentração 1,0 mg/mL e, a partir desta, o crescimento diminuiu. O comprimento radicular foi significativamente reduzido quando os extratos clorofórmico e etéreo (5,0 mg/mL) foram incorporados no crescimento médio, reduzindo respectivamente o crescimento a 81,57% e 79,35%, cinco vezes menores que o controle. O maior estímulo significativo em relação ao controle foi observado pelo extrato etéreo (0,1 mg/mL), que aumentou em 61,17% o comprimento radicular.

Quanto a produção de pêlos radiculares, o extrato acetônico (0,01 mg/mL) reduziu a indução, o extrato acetônico a 0,1 mg/mL manteve a integridade da formação de pêlos intacta, o extrato

clorofórmico (1,0 mg/mL) restringiu esse desenvolvimento à base e o mesmo extrato a 5,0 mg/mL aumentou a formação de pêlos. Com exceção desses tratamentos, todos os extratos eliminaram essa formação.

Tabela 1. Resultado da análise de variância do comprimento do hipocótilo, da radícula e da biomassa das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	HIPOCÓTILO			RADÍCULA			MASSA		
	F	G.L	p	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	39,388	5	<0,001	39,14	5	<0,001	2,80	5	0,025
Extrato	50,064	2	<0,001	2,66	2	0,079	4,59	2	00,014
Concentração*Extrato	24,659	10	<0,001	3,66	10	<0,005	3,51	10	<0,005

Quase todos os extratos levaram ao desenvolvimento de raízes secundárias, que variaram no tamanho de acordo com a concentração. O extrato etéreo a 0,01 mg/mL levou a formação de poucas raízes secundárias. Na figura 2, pode-se observar que o tratamento etéreo (0,01 mg/mL), juntamente com o controle e o tratamento acetônico (0,01 mg/mL) induziu a formação de raízes secundárias longas e, o etéreo (1,0 mg/mL) e clorofórmico (2,5 mg/mL) levaram ao desenvolvimento de raízes secundárias médias e as pequenas foram induzidas pelo tratamento etéreo (2,5 e 5,0 mg/mL) e acetônico (5,0 mg/mL). O extrato clorofórmico a 1,0 mg/mL restringiu a formação desse incremento à base radicular. Pode-se, dessa forma, inferir que à medida que a concentração é aumentada, o tamanho das raízes secundárias é diminuído como efeito dose-redução. Diante disso, é possível que os extratos de *C. verticillaris* estejam interferindo no balanço hormonal das plântulas de *L. sativa*, pois segundo Aloni *et al.* (2006), a deficiência de citonina e altos níveis de auxina levam a formação precoce de raízes laterais. Segundo Pina (2008), baixos níveis de etileno/auxina são inibidores de formação de raízes laterais e, portanto, sua presença se torna importante no processo de ramificações nas raízes. Alterações na formação de pêlos, tamanho radicular e presença de raízes laterais também foram observadas por Oliveira (2004), Jerônimo (2006) e Pina (2008).

Quanto à morfologia radicular (Tab. 2), as plântulas do tratamento clorofórmico (1,0 mg/mL) foram caracterizadas como plântulas normais com pequenos defeitos, devido ao ápice radicular apresentar-se extremamente fino (Fig. 3F). A concentração de 2,5 mg/mL induziu a formação de plântulas anormais quando tratadas com extrato etéreo (radículas principais finas, oxidadas e muitas raízes secundárias pequenas) e plântulas com pequenos defeitos quando tratadas com extrato clorofórmico e etéreo (radícula muito fina). Em todos os extratos testados, a concentração 5,0 mg/mL levou ao desenvolvimento de plântulas anormais com raízes oxidadas, amolecidas e necroses apicais

(Fig. 3).

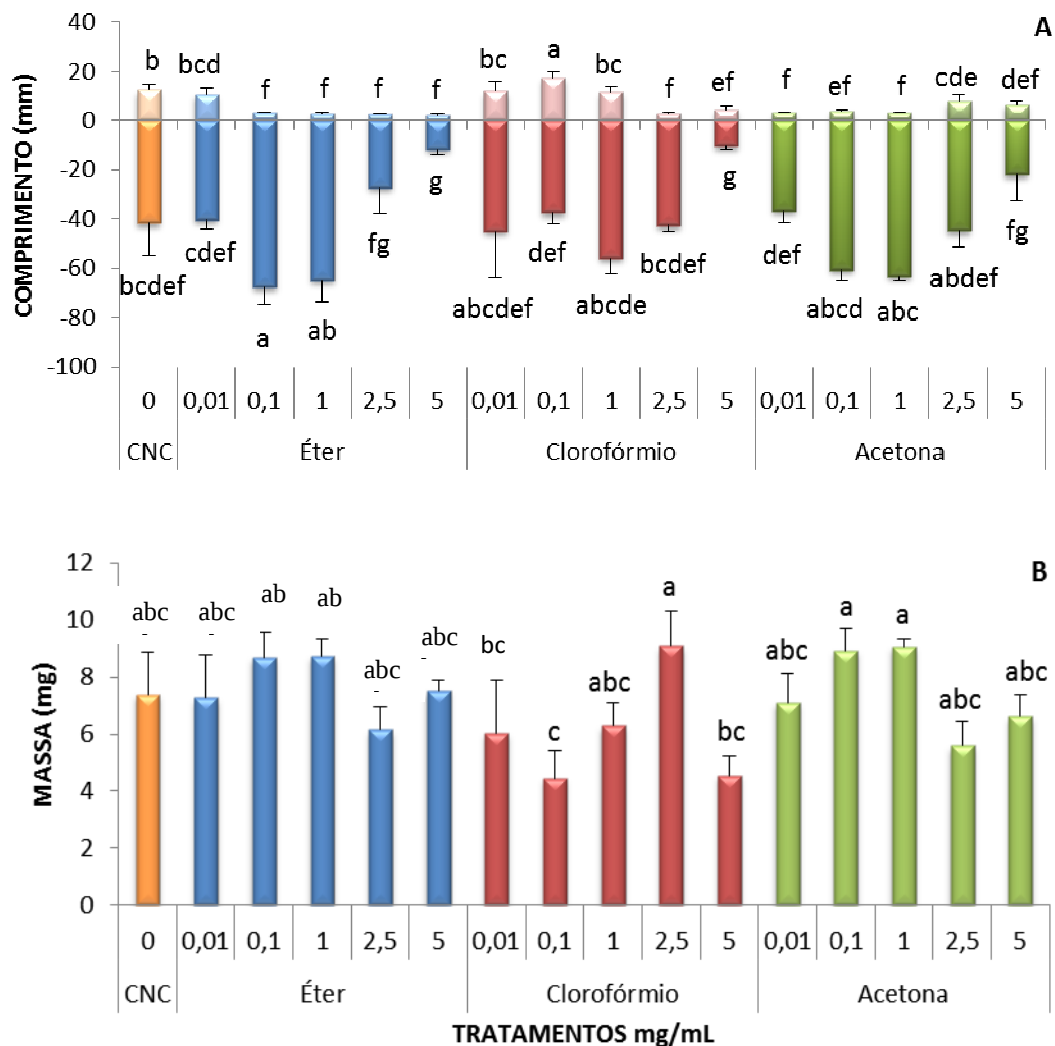


Figura 1. Valores médios da biomassa (A) e do comprimento hipocotilar e radicular (B) de plântulas de *Lactuca sativa* crescidas por dez dias em doses crescentes de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris*, mais o controle (CNC). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Diferenciação anatômica e morfológica da raiz de plântulas quando submetidas a extratos vegetais foram observadas por Oliveira (2003). Todavia, além de inibição do crescimento radicular, mudanças estruturais em algumas organelas, na membrana plasmática e na parede celular podem ocorrer por respostas a aleloquímicos (Cruz-Ortega, 1998). As respostas fisiológicas e morfológicas das plântulas à exposição a esses compostos são manifestações secundárias decorrentes de alterações moleculares e celulares, cujos mecanismos ainda permanecem obscuros (Ferreira & Áquila, 2000). Quase todos os extratos de *C. verticillaris* causaram diminuição significativa do crescimento do

sistema hipocotilar com exceção do extrato etéreo a 0,01 mg/mL e clorofórmico a 0,01 e 1,0 mg/mL (Fig 1A). O maior e único efeito estimulador desse sistema foi verificado nas plântulas submetidas ao extrato clorofórmico a 0,1 mg/mL (aumento de 75,08%). Os maiores efeitos inibidores foram observados pelos extratos etéreos a 5,0 mg/mL (80,45%), 2,5 mg/mL (79,81%), 1,0 mg/mL (76,2%), clorofórmico a 2,5 mg/mL (76,36%), acetônico a 1,0 mg/mL (75,48%) e etéreo a 0,1 mg/mL (75,08%), respectivamente, em relação ao controle. Esses extratos inibiram o crescimento hipocotilar em quase cinco vezes em relação ao controle. Resultados semelhantes sobre redução significativa da parte aérea de plântulas também foram observados por Pina (2008).

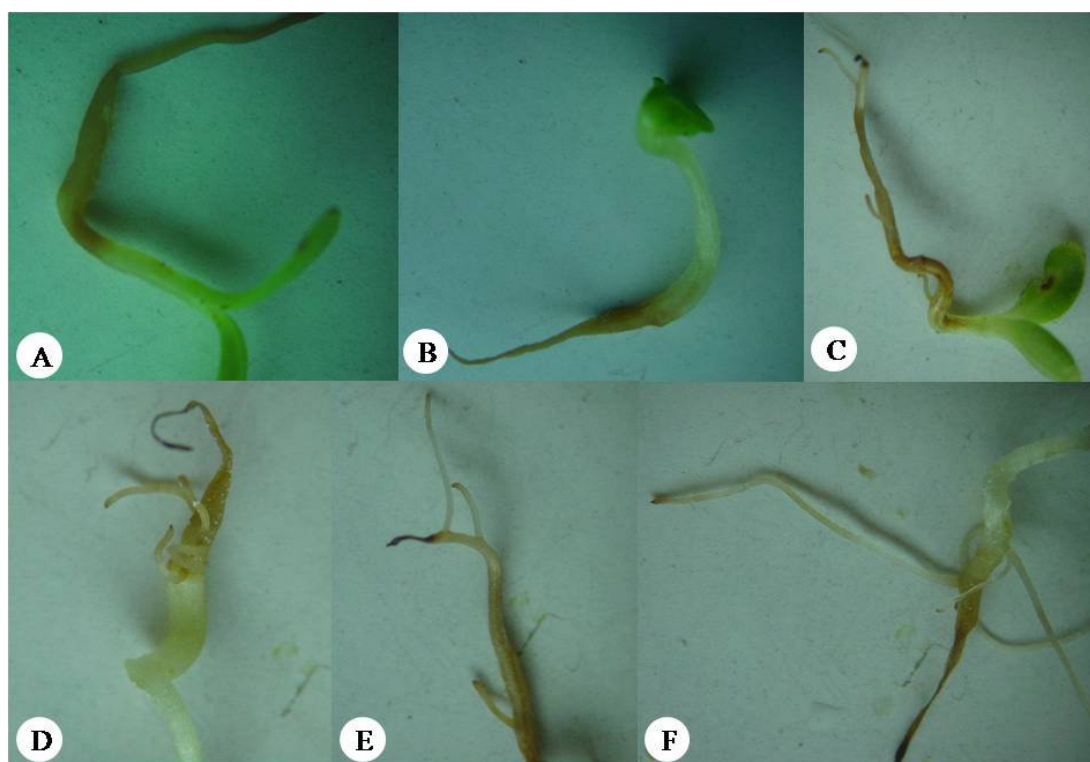


Figura 2. Plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos extratos de *Cladonia verticillaris*. **A.** Controle; **B.** Tratamento etéreo 0,01 mg/mL, com raízes secundárias longas e folhas largas. **C.** Tratamento etéreo 0,1 mg/mL, com radícula comprida sem raiz secundária e sem pêlos. **D.** Tratamento etéreo 1,0 mg/mL, com raízes secundárias médias e eófilo bem desenvolvido. **E.** Tratamento clorofórmico 0,01 mg/mL com raízes secundárias longas. **F.** Tratamento clorofórmico 1,0 mg/mL; **G.** Tratamento clorofórmico 2,5 mg/mL; **H.** Tratamento acetônico 0,01 mg/mL, sem eófilos; **I.** Tratamento acetônico 0,1 mg/mL, Plântula bem desenvolvida com eófilo grande e radícula normal; **J.** Tratamento acetônico 1,0 mg/mL, com radícula muito grande; **K.** Tratamento acetônico 2,5 mg/mL, com radícula extremamente fina, frágil e escura; **L.** tratamento acetônico 5,0 mg/mL, com radícula escura e eófilo desenvolvido.

Tabela 2. Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de *Cladonia verticillaris* sobre *Lactuca sativa* quando submetidas às doses crescentes dos extratos.

Concentrações (mg/mL)	Extrato etéreo	Extrato Clorofórmico	Extrato acetônico
0,0	Normal	Normal	Normal
0,01	Normal	Normal	Normal
0,1	Normal	Normal	Normal
1,0	Normal	Normal*	Normal
2,5	Anormal	Normal*	Normal*
5,0	Anormal	Anormal	Anormal

* Com pequenos defeitos

**Figura 3.** Toxicidade das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos extratos de *Cladonia verticillaris* na concentração 5,0 mg/mL. A e B. Tratamento clorofórmico, raízes escuras e amolecidas, região apical muito fina e oxidada, espessamento na base; C e E. Radícula escura e amolecida, raízes secundárias pequenas, necroses apicais e hipocótilo enrolado. D e F. Tratamento etéreo, raízes secundárias pequenas e outras médias, necrose apical, espessamento na base radicular e região apical extremamente fina.

Na figura 1B estão representados os efeitos dos extratos sobre a massa seca das plântulas de *L. sativa*. Observou-se que o extrato clorofórmico apresentou diferentes resultados. A concentração de 0,1 e 5,0 mg/mL induziram a uma redução significativa no peso seco das plântulas. A concentração de 2,5 mg/mL desse mesmo extrato promoveu efeito contrário com um maior investimento de

elementos/nutrientes. O extrato etéreo a 5,0 mg/mL apesar de ter causado maior efeito inibidor no comprimento das plântulas, não influenciou significativamente na aquisição de nutrientes. Segundo Carmo *et al.* (2007) é possível que estes extratos estejam atuando sobre a permeabilidade da membrana e/ou sobre o balanço hídrico e aquisição de nutrientes.

Os resultados sugerem que os extratos de *C. verticillaris* interferem como bioherbicidas de pós-emergência influenciando o crescimento através da redução do comprimento radicular, hipocotilar e foliar e da interferência na biomassa de plântulas de *L. sativa*. Esses resultados refletem todas as mudanças que ocorrem no processo de crescimento no decurso do experimento, que estão diretamente conectados com a inibição de vários processos fisiológicos que podem afetar outras vias como a fotossíntese, absorção de nutriente, concentração de nitrogênio e variação na reserva hídrica (Garnier, 1991; Poorter & Nagel, 2000).

Quanto a morfologia hipocotilar somente o extrato acetônico a 5,0 mg/mL produziu plântulas anormais com hipocótilos enrolados (Fig. 3C e 4D). Embora tenha sido registrada a inibição tanto da radícula quanto do hipocótilo, este foi mais afetado em relação ao controle. Contudo, morfológicamente os efeitos constatados foram mais drásticos sobre o comprimento radicular. Para Cruz Cruz-Ortega *et al.* (1998), os indivíduos estavam em um estágio de desenvolvimento em que o crescimento do sistema radicular é priorizado, portanto, os efeitos deletérios sobre o metabolismo desse órgão são mais drásticos, uma vez que ele é o alvo primário dos aleloquímicos, principalmente durante o desenvolvimento inicial da planta, que é caracterizado por alto metabolismo e sensibilidade ao estresse ambiental.

Com exceção dos tratamentos etéreo (0,01 mg/mL) e clorofórmico (0,01; 0,1 e 1,0 mg/mL), os demais extratos levaram a um desequilíbrio do eixo hipocótilo-radícula, produzindo radículas muito grandes em relação ao hipocótilo, podendo ser que em condições naturais essas plântulas não se estabelecessem, por interferir na translocação de nutrientes desses dois sistemas. Segundo Raven (2001), a absorção eficiente de nutrientes por plântulas que são submetidas a extratos é devida à redução no tamanho radicular, presença de raízes laterais e pêlos absorventes. Visto que plantas do cerrado necessitam de raízes profundas para sua sobrevivência, é possível que *C. verticillaris*, coloque em risco espécies vegetais adjacente pela liberação de substâncias que diminui o sistema radicular. É provável também que o endemismo dessa espécie em áreas de cerrado (tabuleiro), possa ser atribuído além das condições edafoclimáticas ao efeito alelopático que favorece a espécie menor pressão competitiva.

O comprimento foliar também foi significativamente inibido por quase todos os extratos em relação ao controle (Tab. 3 e Fig. 5), com exceção do etéreo (0,01 e 0,1 mg/mL) e acetônico a 0,1

mg/mL. O extrato etéreo produziu efeito dose-redução. As maiores inibições foram observadas pelo extrato etéreo a 5,0 mg/mL (40, 74%), 2,5 mg/mL (40,49%) e clorofórmico a 5,0 mg/mL (38,8%).



Figura 4. Plântulas anormais de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos extratos de *Cladonia verticillaris*. **A - D.** À esquerda é o controle **A.** tratamento acetônico 5,0 mg/mL; **B.** Tratamento acetônico com raiz secundária muito longa e raiz principal fina no ápice. **C.** Tratamento acetônico 2,5 mg/mL, com radícula muito longa, fina e escurecida; **D.** Tratamento etéreo 5mg/mL, com hipocótilo enrolado e radícula frágil; **E.** Tratamento etéreo 5,0 mg/mL. **F.** Tratamento clorofórmico 5,0 mg/mL, com radícula inibida e oxidada.

Tabela 3. Resultado da análise de variância do comprimento, largura e área foliar das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas à ação de diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* em cinco concentrações, mais o controle (0%).

	COMPRIMENTO FOLIAR			LARGURA FOLIAR			ÁREA FOLIAR		
	F	G.L	p	F	G.L	p	F	G.L	p
Concentração	48,75	5	<0,001	7,76	5	0,708	1,21	5	0,316
Extrato	1,52	2	0,2286	17,6	2	0,271	1,47	2	0,23
Concentração* Extratoo	5,83	10	<0,005	14,9	10	0,352	1,35	10	<022

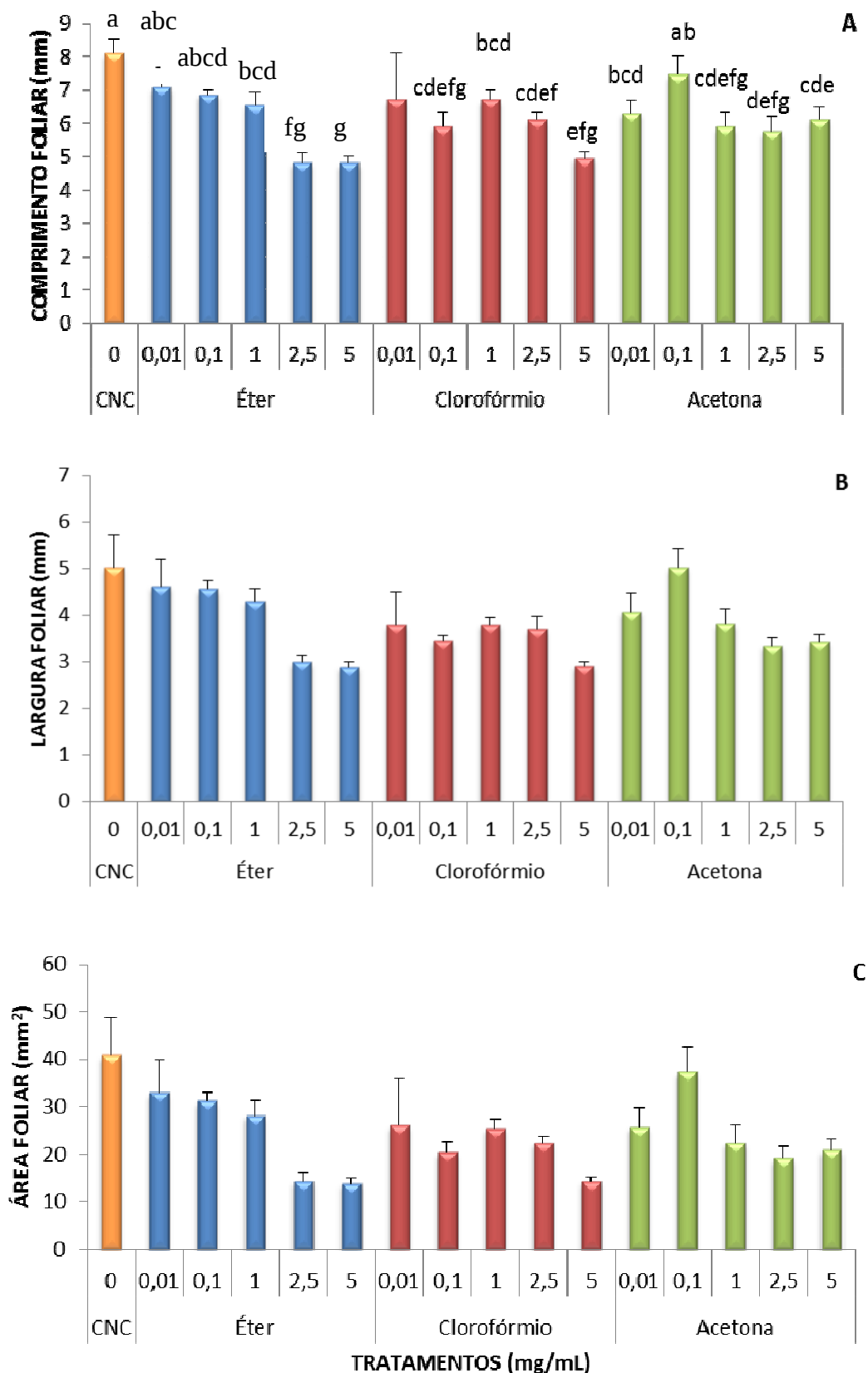


Figura 5. Valores médios do comprimento (A), da largura foliar (B) e da área foliar (C) de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes doses de extratos de *Cladonia verticillaris*, mais o controle (CNC), durante dez dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Todas as concentrações inibiram o comprimento hipocotilar e foliar, e a intensidade desse efeito dependeu do extrato. Quanto ao parâmetro largura e área foliar, os resultados não foram significativos (Tab. 3), mas foi possível observar um leve estímulo causado pelo extrato acetônico a 5,0 mg/mL. Assim como o controle, quase todos os extratos induziram a formação de eófilos, sendo este crescimento bastante expressivo quando tratados com extratos acetônico a 0,1 mg/mL e etéreo a 1,0 mg/mL. O extrato acetônico a 0,1 mg/mL levou ao crescimento de plântulas bem desenvolvidas (intactas) em relação ao controle. Quanto a morfologia foliar pode-se notar formação de pecíolo muito grande causado pelo extrato clorofórmico 1,0 mg/mL. O extrato acetônico a 2,5 e 5,0 mg/mL produziram plântulas anormais com folhas queimadas, amareladas, desbotadas e pequenas. Vários autores têm reportado que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (Einhellig & Kuan, 1971; Einhellig & Rasmussen, 1979; Blum & Rebbeck, 1989; Baziramakenga *et al.*, 1994; Chou, 1999). A aparência clorótica das plantas seria um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (Einhellig, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (Duke, 1985; Cayon *et al.*, 1990).

Resultados semelhantes também foram obtidos por Lechowski *et al.* (2005) os quais observaram que o crescimento das plântulas de tomate era reduzido com o aumento da concentração de ácido úsnico. Eles observaram que ocorria a mortalidade das plântulas quando essas eram submetidas a prolongados dias com o composto, e que o limbo foliar era drasticamente reduzido à medida que se aumentava a concentração da substância. Como estes autores relataram que o ácido úsnico não afetava plantas vasculares pela inibição de uma única unidade fisiológica, os dados deste trabalho também sugerem que as substâncias liquênicas de *C. verticillaris* podem afetar vários processos, tendo antes um efeito fitotóxico geral, dependendo da concentração utilizada. Este postulado pode ser corroborado pelos resultados de Or'us *et al.* (1981) e Nishitoba *et al.* (1987) que observaram que uma população epífita de líquens causava desfolha, inibição do crescimento e, finalmente, a morte de plantas. Estes efeitos dos extratos de *C. verticillaris* sobre o crescimento de *L. sativa* podem ter afetado vários processos metabólicos que provavelmente estejam associados com ação de enzimas fundamentais (Vavasseur *et al.*, 1991).

Fischer *et al.* (1989), compararam o efeito inibidor de seis lactonas sesquiterpênicas sobre a germinação de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas e observaram inibição a concentrações muito baixas (1 mM), corroborando com os resultados obtidos de redução do comprimento foliar e hipocotilar neste trabalho, quando as plântulas de *L. sativa* eram tratadas com extratos acetônicos de *C. verticillaris*.

Aparentemente, a maior parte, senão todos os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração para determinadas partes das plantas, podem ser estimulantes quando presentes em determinadas faixas de concentração para outros órgãos (Rice, 1984).

Dentre as características químicas, a avaliação do pH dos extratos é fundamental quando se desconhece sua constituição em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, íons e outras moléculas, pois valores extremos de pH dos extratos podem atuar sobre as plântulas e mascarar o efeito alelopático (Ferreira & Aquila, 2000). No caso presente, pode-se observar na tabela 4, que os valores de pH encontrados, podem estar associados a variações na disponibilidade de elementos/nutrientes em solução. Por isso, estão dentro de uma faixa de valores aceitáveis como não interferentes sobre o desenvolvimento de *L. sativa*.

Tabela 4. Valores de pH dos extratos de *Cladonia verticillaris* na concentração 5,0 mg/mL

EXTRATOS	pH
Etéreo	5,0
Clorofórmico	5,5
Acetônico	6,0

Em análises de cromatografia de camada delgada (CCD) realizadas por Tigre *et al.* (in press) evidenciou-se a presença do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO), compostos majoritários da espécie em estudo, apenas no extrato acetônico e, a presença de compostos intermediários não identificados a todos os extratos analisados. Esses, possivelmente são compostos fenólicos que juntamente com o PRO fazem parte da rota biogenética do FUM. Porém, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) evidenciou a presença de FUM e PRO em todos os extratos, demonstrando altas concentrações de PRO no extrato acetônico (Tab. 5).

Tabela 5. Resultado das análises dos extratos de *Cladonia verticillaris* submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .

EXTRATO	TR	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	COMPOSTO
Etéreo	3,6695	831,806	2,394	PRO
	3,3087	232,788	0,799	PRO
Clorofórmico	3,5223	4,707		
	3,8614	193,189	2,382	FUM
Acetônico	3,4664	36.198,152	97,318	PRO
	4,1333	12,862	9,294	FUM
	16,7811	7,421	Não identificado	

De acordo com a figura 6, pode-se notar a presença de um composto não identificado no extrato acetônico, confirmando a eficiência desse solvente para extração de substâncias liquênicas relatado por Vicente (1975). Possivelmente essa substância seja atranorina, que segundo Pereira (1998) é precursora na formação do FUM. É provável que os efeitos alelopáticos observados em *L. sativa* sejam promovidos pelo PRO ou FUM ou pelo sinergismo desses ácidos entre si, ou ainda de ambos os compostos com as substâncias intermediárias visualizadas na CCD. Os compostos fenólicos estão implicados na inibição da germinação de sementes e no estabelecimento de plantas em comunidades vegetais (Rice, 1984). São apontados como aleloquímicos que atuam como herbicidas inibitórios da fotossíntese, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas (Rizvi *et al.*, 1992; Durigan & Almeida 1993).

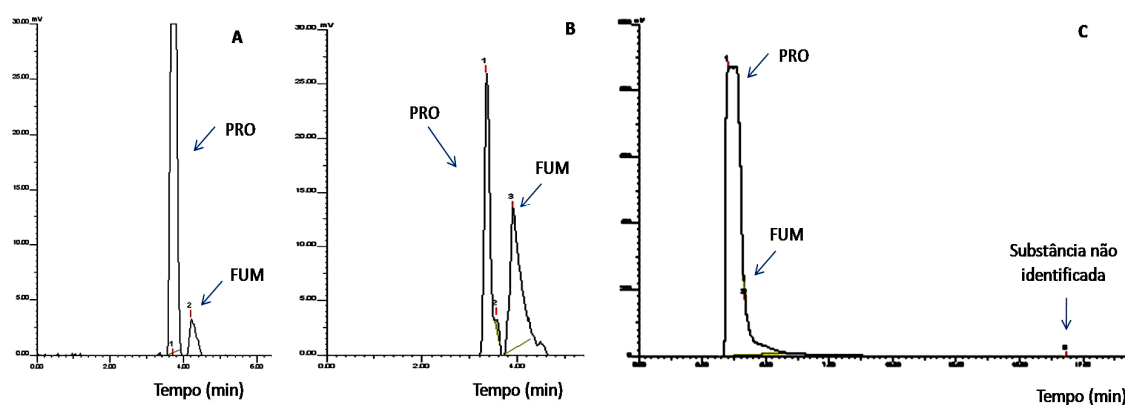


Figura 6. Cromatogramas para quantificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) nos extratos etéreos (A), cloroformico (B) e acetônico (C) a uma concentração de 1 mg/mL.

Não foi possível calcular a concentração do composto de tr 16 min do extrato acetônico. Ele está em concentração muito reduzida, mesmo para a CLAE (Tab. 5).

Os ácidos fenólicos são potentes aleloquímicos que induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo como consequência final a modificação da permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular (Baziramakenga *et al.*, 1995; Ferrarese *et al.*, 2000).

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram a atividade alelopática dos extratos de *C. verticillaris* no crescimento de *L. sativa*, que varia a intensidade do efeito dependendo da concentração e que provavelmente essa potencialidade seja atribuída ao PRO e FUM. Dessa forma, novas pesquisas precisam ser realizadas para detecção de novos mecanismos de ação e conhecimento

químico das substâncias, visto que essa espécie tem potencial para ser utilizada na bioprospecção de herbicidas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa de E. C. Pereira.

REFERÊNCIAS

- Aloni, R., Aloni E., Langhans, M. and Ullrich CI. (2006), Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot.*, **97**, 883-893.
- Ascaso, C. and Rapsch, S. (1985), Chloroplast-ultrastructure and chlorophyll content in leaves from *Quercus* branches with and without lichen thalli. *Plant Cell Env.*, **8**, 651-656.
- Baziramakenga, R., Simard, R.R. and Leroux, G.D. (1994), Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2821-2833.
- Bouaid, K. and Vicent, C. (1998), Chlorophyll degradation effected by lichen substances. *Ann. Bot. Fennici.*, **35**, 71-74.
- Blum, U. and Rebbeck, J. (1989), Inhibition and recover of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. *Journal of Chemical Ecology*, **15**, 917-928.
- Brasil. (1992). Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília.
- Cardarelli, M., Serino, G., Campanella, L., Ercole, P., De Cicco-Nardone, F., Alesiani, O. and Rossiello, F. (1997), Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol. Life Sci.*, **53**, 667-672.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L. and Takaki, M. (2007), Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta bot. bras.*, **21** (3): 697-705.
- Cayon, D.G., Lopes, N.L., Oliva, M.A. and Silva, J.F. (1990), Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **2**, 33-40.
- Chou, C.H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, **18**, 609-636.

- Culberson, C. F. (1972), Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatography method. *J Chromatog.*, **72**,113-125.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Hernández, B.E. and Laguna, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 2039-2057.
- Dias, J.F.G., Círio, G.M., Miguel, M.D. and Miguel, O.G. (2005). Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Rev Bras Farmacogn.*, **15**, 220-223.
- Duke, S.O. (1985), Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. Pp. 91-112. In: S.O. Duke (ed.) *Weed Physiology.*, Vol. II. Boca Raton, CRC Press.
- Durigan, J.C. and Almeida, F.L.S. (1993), Noções sobre alelopatia. Jaboticabal, FUNEP.
- Einhellig, F.A. and Kuan, L. (1971). Effects of scolopoletin on growth, CO₂ exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club.*, **98**, 155-162.
- Einhellig, F.A. and Rasmussen, J.A. (1979). Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. *J. Chem. Ecol.*, **5**, 815-24.
- Engel, S. Pawlik, J.R. (2000), Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar Ecol-Prog Ser.*, **207**: 273-281.
- Einhellig, F.A. (1986), Mechanisms and modes of action of allelochemicals. Pp. 171-188. In: A.R. Putnam & C.H.-S. Tang (eds.). *The Science of Allelopathy*. Nova York, John Wiley and Sons.
- Ferrarese, M.L.L., Souza, N.E., Rodrigues, J.D. and Ferrarese Filho. (2000), Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, **22**, 121-124.
- Ferreira, A.G. and Aqüila, M.E.A. 2000. Alelopatia, uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**, (edição especial) 175-204.
- Fischer, N. H., Weidenhamer, J. D. and Bradow, J. M. ; (1989), Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. *Phytochemistry* , **28**, (9): 2315-2317 .
- Fritz ,D., Bernardi, A.P., Haas, J.S., Ascoli, B.M., Bordignon, S.A.L., and Poser, G. (2007), Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthemum* extracts on *Lactuca sativa* L. *Rev Bras Farmacogn.*, **17**, 44-48.
- Garnier, E. (1991), Resource capture, biomass allocation and growth in herbaceous plants. *Tree*, **6**, 126–131.
- Huovinen, K., Lampero, M., (1989), Usnic acid as a mitotic inhibitor in the *Allium* test. *Planta Med.* **58**, 98.

- Inderjit and Duke, S. O. (2003), Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, **217**, 529-539.
- Jerônimo. C.A. (2006). Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. No desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília.
- Koul, O. (2004), Biological activity of volatile di-n-propyl disulfi de from seeds of neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae), to two species of stored grain pests, *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneun* (Herbst). *J Econ Entomol*, **97**, 1142-1147.
- Krautmann, M., S. Turbay, and E. Riscala. (2001), Efectos alelopáticos de *Tridax procumbens* L. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Tucumán, Fac. de Agronomía y Zootecnia.
- Legaz, M. E. and Vicente, C. (1983) Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol.*, **71**:300-302.
- Lechowski, Z., Mej, E. and Bialczyk, J. (2005), Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. *Environmental and Experimental Botany*, **53** (in press) – praca przyjęta do druku i zostanie opublikowana w 2005 r.
- Liu, Z.L, Xu, Y.J, Wu ,J., Goh, S. and Ho, S.H. (2002), Feeding deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz against two storedproduct insects. *J Agric Food Chem.*, **50**, 1447-1450.
- Mizutani, J. (1999), Selected allelochemicals. *Critical Reviews in Plant Science*, **18**, 653-671.
- Nasir, H., Iqbal, Z., Hiradate, S. and Fujii, Y. (2005), Allelopathic potential of *Robinia pseudo-acacia* L. *J Chem Ecol.*, **31**, 2179-2192.
- Nishitoba, Y., Nishimur, H., Nishiyama, T. and Muzutani, J. (1987), Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, **26**, 3181–3185.
- Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G. and Borghetti, F. (2004), Effect of *Solanun lycocarpum* fruit on sesame seed germination an seedling growth. *Allelopathy Journal*, **13** (2): 201-210.
- Oliveira, A. F. de, Pasqual, M., Chalfun, N. N. J., Regina, M. de A. and Rincón, C. D. R. (2003), Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutúrico. *Ciência e Agrotecnologia*, **27** (1) 117-125.
- Or´us, M.J., Est´vez, P., and Vicente, C. (1981), Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus rotunlifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states. *Physiol. Plant.*, **52**, 263–266.
- Pereira, E.C. (1998), Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular. Recife, 240p. Tese Doutorado em Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.

- Pina, G. O. (2008), Efeitos Alelopáticos de *Eugenia dysenterica* Dc (Myrtaceae) sobre a germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae - gergelim), e *Raphanus sativus* (Brassicaceae - rabanete). Dissertação, Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília.
- Poorter, H. and Nagel, O. (2000), The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrient and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 595–607.
- Raven, P.H., Evert, R.; Eichhorn, S.E. (2001), *Biologia Vegetal*. 6a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 906 p.
- Proksa, B., Sturdikow´a, M., Pr´onayov´a, N., Liptaj, T., 1996. (–)-usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Pharmazie.*, **51**, 195–196.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreira, A. and González, L. (1999), Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science.*, **18**, 577-608.
- Rice, E.L. (1984). *Allelopathy*. 2nd. New York, Academic Press.
- Rizvi, S.J.H., Haque, H., Singh, U.K. and Rizvi, S.J.H. (1992), A discipline called allelopathy. Pp. 1-10. In: S.J.H. Rizvi & H. Rizvi (eds.). *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Londres, Chapman & Hall.
- Romagni, J.G., Meazza, G., Nanayakkara, N.P.D. and Dayan, F.E., (2000), The phytotoxic lichen metabolite usnic acids, is a potent inhibitor of plant *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.*, **480**, 301–305.
- Romeo, J.T. and Weidenhamer, J.D. (1998), Bioassays for allelopathy in terrestrial plants. Pp.179-211. In: K.F. Haynes & J.G. Millar (eds.). *Methods in Chemical Ecology: bioassay methods*. v.2. Massachusetts, Kluwer Academic Publishers.
- Tawaha, A.M. and Turk, M.A. (2003), Allelopathic effects of black mustard (*Brassica nigra*) on germination and growth of wild Barley (*Hordeum spontaneum*). *J Agron Crop Sci.*, **189**, 298-303.
- Vavasseur, A., Gautier, H., Thibaud, M.-C. and Lasc´eve, G. (1991), Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis* L. *J. Plant Physiol.*, **139**, 90–94.
- Vicente, C. (1975), *Fisiologia de las sustancias liquênicos*. 1. Ed. Madrid. Alhandra S.A.

Capítulo 3

BIOATIVIDADE DOS ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris* SOBRE A
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Lactuca sativa* L.

BIOATIVIDADE DOS ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris* SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Lactuca sativa* L.

Rafaela Carvalho TIGRE¹, Eugênia Cristina Gonçalves PEREIRA², Nicácio Henrique da SILVA³, Mauro Guida dos SANTOS⁴, Neli Kika HONDA⁵

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: biotigre@gmail.com
2. Departamento de Ciências Geográficas; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: eugenia.pereira@pq.cnpq.br
3. Departamento de Bioquímica - Laboratório de Produtos Naturais; Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: nhsilva@uol.com.br
4. Departamento de Botânica - Laboratório de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Email: mauroguida@yahoo.com.br
5. Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. Email: nkhonda@nin.ufms.br

RESUMO

Os aleloquímicos liquênicos, que podem representar até 25% do peso seco do talo, têm um importante papel na ecologia dos líquens com função antiherbívoria, podendo afetar o crescimento e desenvolvimento de outros organismos ao seu redor. Com o intuito de verificar o efeito alelopático desses metabólitos, realizou-se este trabalho testando substâncias purificadas de *Cladonia verticillaris*, os ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO), sobre a germinação e do desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*. A partir do extrato acetônico de *C. verticillaris* foram isolados e purificados por recristalizações sucessivas, o FUM e PRO. Estes foram testados nas concentrações de 2,5; 1,0; 0,1 e 0,01mg/mL. As duas substâncias testadas não apresentaram efeito alelopático sobre a germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio. Foi evidenciada a indução do crescimento radicular, hipocotilar e foliar. O FUM 2,5 mg/mL alterou a absorção de nutrientes das plântulas. Os metabólitos secundários de *C. verticillaris* possuem efeito alelopático sobre o desenvolvimento de *L. sativa*.

Termos para indexação: *Cladonia verticillaris*, alelopátia, ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico.

ABSTRACT

The lichen allelochemical, which can act up to 25 % of the dry weight of the stalk, have an important paper in the ecology of the lichen with function antifeedant, being able to affect the growth and development of other organisms to his outline. With the intention of checking the allelopathic effect of these metabolites, this work was performed with the purified substances of *C. verticillaris* on the germination and initial development of *L. sativa*. From the extract acetonic of *C. verticillaris* were isolated and been purified by them for recristalizações successive, the FUM and FOR. These were tested in the concentrations of 2,5; 2,0 and 0,2 mg/mL. Two tested substances did not present effect allelopathic on the germination, rate of speed of germination and middle time. There was shown up the induction of the growth rootlet, leaf and to revel. The FUM 2,5 mg/mL altered the absorption of nutritious ones of the plantules. The secondary metabólitos of *C. verticillaris* have effect allelophthic on the development of *L. sativa*.

INTRODUÇÃO

A alelopatia é um tipo de interação bioquímica, considerada uma forma de adaptação química defensiva, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (Lovett e Ryuntyu, 1992). Os aleloquímicos podem ter origem no metabolismo primário, mas em sua maioria são provenientes do metabolismo secundário (Ferreira e Aquila, 2000) que podem, direta ou indiretamente, interferir no desempenho de outros organismos em sua vizinhança.

Os líquens possuem compostos únicos de sua simbiose através de um alto investimento de energia, que podem representar até 25% do peso do talo seco. Esses compostos têm um papel importante na ecologia desses organismos e recentemente alguns estudos estão sendo realizados para elucidar o potencial alelopático e o modo de ação desses compostos (Romagni *et al.*, 2004). Os aleloquímicos, são responsáveis por uma grande diversidade de efeitos nas plantas. Esses efeitos incluem o atraso ou a inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, injúria no sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas (Rice, 1984).

Alguns estudos já relatam que o (-) ácido úsnico (composto liquênico) inibe a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, uma enzima chave na biossíntese dos carotenóides e que uma série de líquens produtora de análogos da emodina causa branqueamento de gramíneas. Outros estudos sugerem que os compostos liquênicos causam redução no fotossistema II (PSII), mas esse modo de ação ainda não foi determinado. Outro grupo de antraquinonas análogo é reportado como inibidor da germinação de sementes e da formação de raízes primárias. Tolpysheva, (1984) relata a capacidade do ácido fumarprotocetrárico em inibir o crescimento de fungos do solo e Ravinskaya e Vainshetein (1975), a capacidade deste mesmo ácido em inibir a divisão de algas.

Segundo Tejeda-Sartorius e Rodríguez-González (2008), os compostos fenólicos influenciam nas estruturas destinadas à elongação alterando o balanço hormonal (reguladores do crescimento de raiz e hipocótilo). Einhellig (1986) hipotetizou que esses compostos têm seus efeitos primários nas funções de membrana e nas interações hormonais. Estudos mostram que a diversidade de estruturas químicas possibilita diferentes atividades biológicas através do arranjo entre hidroxilas e carbonilas com esqueletos carbônicos (Bradow, 1991).

A via do acetato propicia a produção de uma variedade de ácidos orgânicos, álcoois de cadeia linear, aldeídos e cetonas, muitos dos quais reconhecidos entre os aleloquímicos voláteis liberados durante a decomposição de resíduos (Bradow e Connick, 1990).

Os herbicidas naturais são embasados nos produtos naturais, conhecidos como compostos alelopáticos. Esses têm sido utilizados para o desenvolvimento de herbicidas sintéticos, no entanto necessita de muitas investigações para conhecer as vias (Duke, 2002). Dessa forma, o estudo da alelopatia é importante para produzir herbicidas mais eficazes, seletivos e ambientalmente seguros (Duke, 1990).

Segundo Inderjit, (1996), os extratos usados nos bioensaios para diagnóstico preliminar de alelopatia são misturas de várias substâncias, que podem exercer efeitos aditivos ou sinérgicos, tornando importante a análise da ação de cada substância isoladamente.

Diante isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito alelopático dos aleloquímicos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material liquênico

Cladonia verticillaris, espécie endêmica do litoral brasileiro e tabuleiros do interior do Nordeste, foi coletada na Serra da Prata no município de Saloá, 273km do Recife. Este material foi seco à temperatura ambiente ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$), e mantido em caixas de papelão até uso para os ensaios químicos e biológicos. Parte do material foi depositada no Herbário UFP, registro nº 52.299.

Isolamento e purificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM)

O composto principal da espécie em estudo, FUM, foi isolado e purificado a partir do extrato acetônico. Este, depois de concentrado, foi lavado em funil poroso G-4 com acetona por quatro vezes, de acordo com Asahina e Shibata (1954) e modificação

de Pereira (1998). Após evaporação, foram formados cristais que foram dissolvidos em acetona e recristalizados sucessivamente até maior grau de pureza possível.

Análise química

Foram realizadas medidas de pH de todas amostras. Essas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido HITACHI, acoplado a detector de ultravioleta a 254nm, em coluna de fase reversa C18. A fase móvel foi constituída por metanol/água/ácido acético (80:19, 5; 0,5 v/v), sob um fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, atenuação 0,04 e temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) segundo metodologia de Legaz & Vicente (1983). As amostras foram injetadas em concentrações de 0,01mg/mL, diluídas em metanol. Foram realizadas curvas de calibração para os padrões, FUM e PRO, a partir das quais calculou-se a concentração destes ácidos em cada extrato.

Bioensaio de germinação

O bioensaio de germinação foi realizado em câmara de germinação do tipo BOD (biochemical oxygen demand) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura alternada de 23 a 27°C. Os testes foram realizados em placas de Petri de 9,0cm de diâmetro, revestidas com duas folhas de papel filtro previamente autoclavadas a 120°C por 30 minutos. Em cada placa adicionaram-se 3,0mL de cada substância (FUM ou PRO) nas concentrações de 0,02; 0,2; 2,0 e 5,0 mg/mL. Em seguida, as placas contendo os papéis de filtro umedecidos com extrato, foram secas em um fluxo laminar durante 12h. Decorrido este período, o papel de filtro foi reumedecido com 6,0 mL de água destilada, obtendo-se a concentração 0,01; 0,1; 1,0 e 2,5 mg/mL. O controle foi obtido com o uso de água destilada.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições de 50 aquênios de *L. sativa* por placa. A taxa de germinação foi verificada a cada 12 horas durante sete dias possibilitando a avaliação da germinabilidade total, do tempo médio, do índice de velocidade germinação (IVG) e da biometria segundo a metodologia de Laboriau (1983), Edmond e Draphala (1958), Maguire (1962) e Benicasa (1988), respectivamente. Foram consideradas germinadas as plântulas que apresentaram 2mm de protrusão radicular (Brasil, 1992).

Após sete dias de crescimento, o comprimento da radícula de cada plântula foi medido com o auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5%. Os valores de percentagem foram transformados em arco seno (arco seno ($\sqrt{\%}$)) (Labouriau, 1983).

Bioensaio de crescimento

Os bioensaios foram realizados da mesma forma que o bioensaio de germinação, porém em cada placa foram colocadas 10 plântulas de *Lactuca sativa*, pré-germinadas em água destilada por 48 horas. Essas placas foram vedadas e incubadas em uma BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias. As plântulas foram submetidas aos FUM e PRO nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0 e 2,5 mg/mL, tendo água destilada como controle. Após esse período, foram medidos o eixo hipocótilo-radícula e área foliar (comprimento X largura). Essas plântulas também foram caracterizadas quanto anormais e normais segundo Brasil (1992) e calculada a massa seca das plântulas. Foram utilizadas quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Análise estatística

Os dados se processaram mediante análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$) para confrontação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaio de germinação

Os aleloquímicos de *C. verticillaris* (FUM e PRO) não foram significativos para os parâmetros de germinabilidade, primeira contagem, IVG e tempo médio de germinação. Segundo Ferreira e Áquila (2000), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto: a semente germina ou não germina. Reigosa *et al.* (1999) afirmam que os aleloquímicos podem atuar em

vários processos simultaneamente e ter uma resposta diferenciada para cada um, dependendo da concentração dos compostos. Esses resultados demonstram que essas substâncias podem ser promotoras do efeito alelopático observado em trabalhos anteriores (Tigre *et al. in press*), visto que foram observados resultados semelhantes sobre a germinabilidade e primeira contagem dos aquênios de *L. sativa*. Contudo, pode-se inferir que houve ação sinérgica dos aleloquímicos entre si ou com outros compostos presentes em *C. verticillaris*, visto que extratos brutos dessa espécie apresentam diminuição no vigor das plântulas de *L. sativa*, diminuindo a curva de germinação em relação ao tempo (Tigre *et al. in press*), dado não observado nas plântulas quando submetidas aos compostos isolados FUM e PRO.

Na Tabela 1 pode-se observar que o PRO na concentração 0,01 e 1,0 mg/mL induziu a um leve estímulo na germinabilidade total dos aquênios de *L. sativa*. Notou-se também que primeira contagem, foi induzida pelo PRO, e o FUM teve a tendência a inibir, sendo o maior valor observado pelo PRO 1,0 mg/mL.

Tabela 1. Valores médios da germinabilidade, primeira contagem, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio (T.M) dos aquênios de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e ácido prtocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris*.

Tratamentos	Concentrações (mg/mL)	Germinabilidade (%)	Primeria Contagem (%)	IVG	T.M
Controle	0	80,975	78,09	1,689154	0,000866
FUM	0,001	81,345	79,4625	1,637401	0,000976
	0,1	82,39	74,5925	1,626521	0,000922
	1,0	81,785	73,8475	1,659425	0,000793
	2,5	82,39	76,72	1,675926	0,000887
PRO	0,01	90	83,9025	1,640278	0,000936
	0,1	80,015	76,8975	1,666038	0,000879
	1,0	87,9675	87,9675	1,574058	0,001017

Quanto ao IVG, observou-se que as duas substâncias diminuíram o vigor das plântulas, sendo tal efeito mais pronunciado com o PRO 1,0mg/mL. Apesar desse tratamento ter influenciado o aumento da germinabilidade total, ele levou a uma redução na viabilidade dos aquênios. Resultados semelhantes com esse ácido foram observados no tempo médio, no qual notou-se que a concentração 1,0mg/mL aumentava

os valores destes parâmetros, enquanto diminuía para o FUM, apesar de não haver diferença significativa para os tratamentos.

Em relação aos parâmetros biométricos, as causas de variação (substâncias *versus* concentração) apresentaram-se significativas em relação ao controle. Todos os tratamentos induziram o crescimento hipocotilar, principalmente quando tratadas com PRO (1,0mg/mL), que aumentou esse órgão em mais de duas vezes em relação ao controle (Fig. 1). O comprimento radicular foi estimulado por todos os tratamentos, obedecendo ao modelo dose redução, no qual à medida que se aumentava a concentração aumentava-se também o comprimento radicular (Fig. 2). Esse efeito foi observado até a concentração 1,0mg/mL e a partir dessa houve redução, porém, ainda assim com características fitorreguladoras (Fig. 1). O PRO (0,1mg/mL) induziu a formação de raízes laterais (Fig. 2C) e o FUM (0,01mg/mL) não levou à eliminação dos pêlos radiculares. Segundo Tigre *et al.* (*in press*), em extratos brutos de *C. verticillaris* são encontradas concentrações significativas destes compostos, sendo possível inferir que estes são os responsáveis pelas alterações no balanço hormonal interferindo nos níveis de citocinina, etileno e auxina. Taiz e Zeiger (2004) descrevem que plântulas crescidas na presença de inibidores de etileno exibem redução na formação de pêlos radiculares. Segundo Lorteau *et al.* (2001), esse processo ocorre devido algum tipo de estresse, o qual no presente trabalho pode estar relacionado à presença do aleloquímico. Este pode estar induzindo a deficiência de citocinina e altos níveis de auxina que levam a formação precoce de raízes laterais (Aloni, *et al.*, 2006).

Para os parâmetros foliares, as causas de variação apresentaram-se significativas somente para o comprimento foliar. Na Figura 3 observa-se que este foi estimulado por todos os tratamentos, principalmente pelo PRO (0,01mg/mL), que foram induzidas somente pelo PRO (0,1mg/mL) (Fig. 3).

Jacobi e Ferreira (1991) também observaram em seus experimentos que a parte aérea e as raízes de *L. sativa* apresentaram respostas diferentes ao aleloquímicos, demonstrando que esses dois sistemas são mais sensíveis, afetando mais o desenvolvimento e/ou crescimento que a germinação. Segundo Ferreira e Borghetti (2004) a emergência da plântula e o seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese do indivíduo.

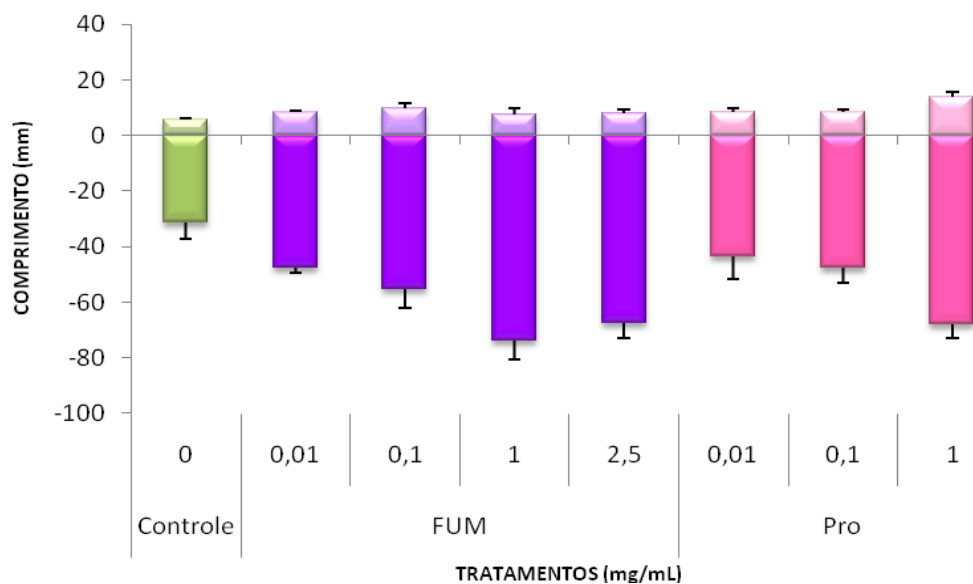


Figura 1. Valores médios do hipocótilo e da radícula de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* no processo germinativo, durante sete dias.



Figura 2. Toxicidade das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* comparadas ao controle (CNC). Plântulas com sete dias de idade. **A.** Plântulas submetidas ao ácido protocetrárico (PRO) 0,01mg/mL com radículas finas no ápice, presença de pêlos radiculares no controle. **B.** Plântulas com PRO 0,01 mg/mL, com raízes laterais. **C.** Plântulas com PRO 0,1 mg/mL demonstrando raízes laterais. **D.** Plântulas com ácido fumarprotocetrárico (FUM) 0,01mg/mL mostrando raízes laterais e radículas apicais finas. **E-G.** Plântulas com FUM mostrando raízes longas e finas. **E.** FUM 0,1mg/mL. **F.** FUM 1,0mg/mL. **G.** FUM 2,5mg/mL.

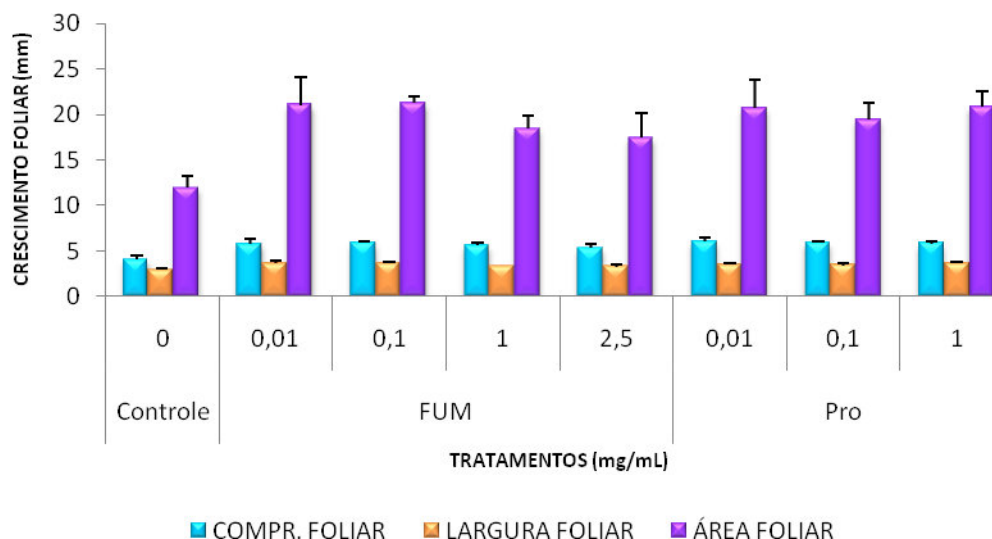


Figura 3. Valores médios do crescimento foliar das plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* durante o processo de germinação. Plântulas com sete dias de idade.

Bioensaio de Crescimento

Em relação aos parâmetros biométricos pode-se notar que o PRO (0,1mg/mL) estimulou significativamente o comprimento radicular. Em todas as concentrações testadas o PRO produziu maiores induções do crescimento, sendo bem expressivo o resultado deste tratamento quando comparado com o FUM, nessa mesma concentração, em relação ao controle (Fig. 4). O comprimento hipocotilar também apresentou-se significativo ao analisar as causas de variação substâncias *versus* concentração. Nessa análise observou-se que o PRO (0,1mg/mL) produziu resultados bastante diferentes do FUM na mesma concentração. Nesse parâmetro o PRO apresentou características inibidoras e o FUM estimuladoras do crescimento hipocotilar. Dessa forma, pode-se inferir que ambas as substâncias alteram o crescimento das plântulas de *L. sativa* sem causar desequilíbrio ao eixo hipocótilo-radícula, uma vez que quando induziam o aumento de um dos órgãos, elas diminuía o crescimento do outro, garantindo o equilíbrio e a normalidade das plântulas. Quanto a morfologia radicular, notou-se que o FUM (0,1mg/mL) promovia o espessamento da base radicular, o que também foi observado por Cruz-Ortega *et al.*(1998) em seus experimentos. Porém, esse tratamento juntamente com PRO (0,01mg/mL) não afetaram a formação de pêlos. O FUM

(0,01mg/mL) induziu um elevado crescimento da radícula. As menores concentrações (0,01 e 0,1mg/mL) de ambos os compostos levaram a indução da formação de raízes laterais, sendo bastante expressiva quando tratadas com FUM (0,01mg/mL).

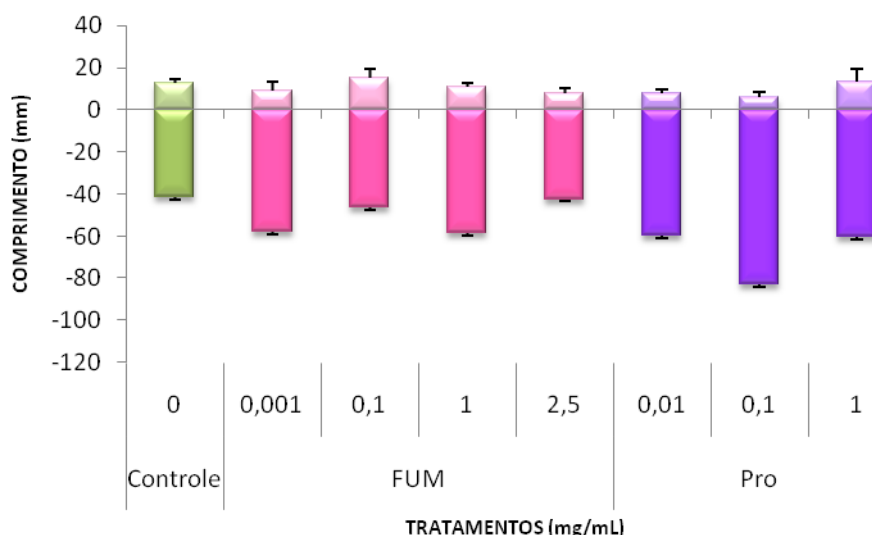


Figura 4. Valores médios do comprimento da radícula e do hipocótilo de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade.

Quanto ao comprimento foliar, as causas de variação mostraram-se significativas em relação ao controle. Todos os tratamentos levaram a diminuição desse parâmetro através do modelo dose-redução, sendo esses resultados mais expressivos com FUM, principalmente na concentração 2,5mg/mL (Fig. 5).

A largura foliar não apresentou resultados significativos, mas pode-se notar uma diminuição do crescimento em todos os tratamentos analisados quando comparado ao controle. As maiores inibições foram observadas por PRO 1,0mg/mL (Fig. 4). Quanto à área foliar, os resultados foram significativos, referentes às maiores concentrações. O FUM apresentou o modelo dose-redução e, as maiores inibições foram observadas para o PRO (1,0 mg/mL) e FUM (2,5 mg/mL) (Fig. 5). Notou-se que a concentração 0,1 mg/mL induziu efeitos opostos nas duas substâncias testadas.

Somente o PRO (0,01 e 0,1 mg/mL) induziram a formação de eófilos pequenos, semelhantes ao controle, e a concentração 1,0 mg/mL apresentou resultado diferencial

morfologicamente na planta por inteiro, evidenciando hipocótilo muito grande, folhas pequenas e raízes medianas em relação ao controle e demais tratamentos.

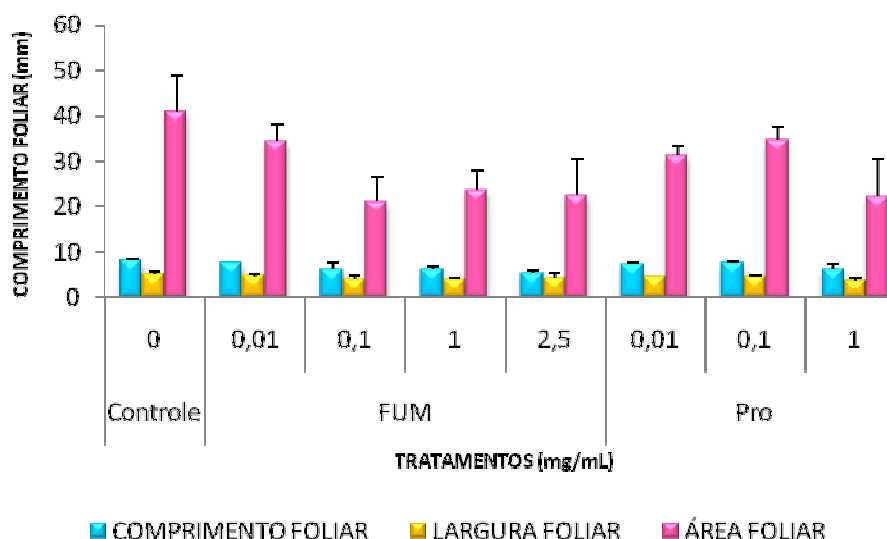


Figura 5. Valores médios do comprimento foliar de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade.

O comprimento das plântulas ou radículas são os parâmetros mais usados para avaliar o efeito alelopático sobre o desenvolvimento e/ou crescimento (Inderjit e Dashini, 1995). Em relação a esses efeitos, os danosos são mais comuns que os benéficos.

Balke (1985) relatou em seus estudos que os compostos liquênicos podem diminuir a captação de nutrientes de plantas vasculares. Esses resultados podem ser observados através da biomassa e da quantificação de nutrientes absorvidos. Folman e Peters (1966) relatam que os ácidos lecanórico, úsnico e girofórico são capazes de inibir o crescimento e a produção de biomassa de plantas testes. Quanto à massa seca (Fig. 6), as plântulas tiveram redução na absorção de nutrientes em todas as concentrações testadas, tendo um efeito mais severo ocasionado pelo FUM na maior concentração (2,5mg/mL). Porém nas concentrações mais baixas (0,01 e 0,1mg/mL) o PRO induziu a maiores reduções. Dessa forma, é possível inferir que *C. verticillaris* em condições naturais altere o metabolismo da vegetação adjacente, interferindo na absorção de nutrientes e no balanço hídrico, visto que esse composto necessita estar em condições mínimas para ativação desse efeito alelopático. Isso é possível porque nessas condições

os organismos não liberam grandes quantidades de substâncias, necessitando em muitos casos estar em condições de estresse, e as quantidades liberadas não ficam disponíveis na sua totalidade, podendo ser modificadas pelos microrganismos presentes no solo. Esses podem aumentar a potencialidade do composto ou ainda utilizar os elementos disponíveis da degradação em seu metabolismo, diminuindo dessa forma a disponibilidade para atuação sobre a vegetação. Contudo, Dawson *et al.* (1984) relatam que as substâncias líquênicas são consideradas resistentes à decomposição por microrganismos e, dessa forma, permanecem por longos períodos no solo. Ferreira e Áquila (2000) citam a adsorção das micelas como um dos fatores responsáveis também pelo seqüestro dos aleloquímicos. Esses resultados vêm demonstrar a capacidade dos compostos analisados a serem utilizados pelas indústrias agroquímicas, mediante as propriedades alelopáticas (herbicidas naturais), os quais nesse caso não requerem grandes quantidades para atuação. Os resultados apresentados evidenciam também a habilidade sinérgica do FUM e do PRO, já que em trabalhos anteriores (Tigre *et al. in press*) os efeitos obtidos pelos extratos brutos foram mais drásticos sobre o crescimento das plântulas. Essa habilidade é possível uma vez que os extratos analisados possuem uma miscelânea de compostos os quais foram detectados pela cromatografia de camada delgada - CCD (Tigre *et al. in press*).

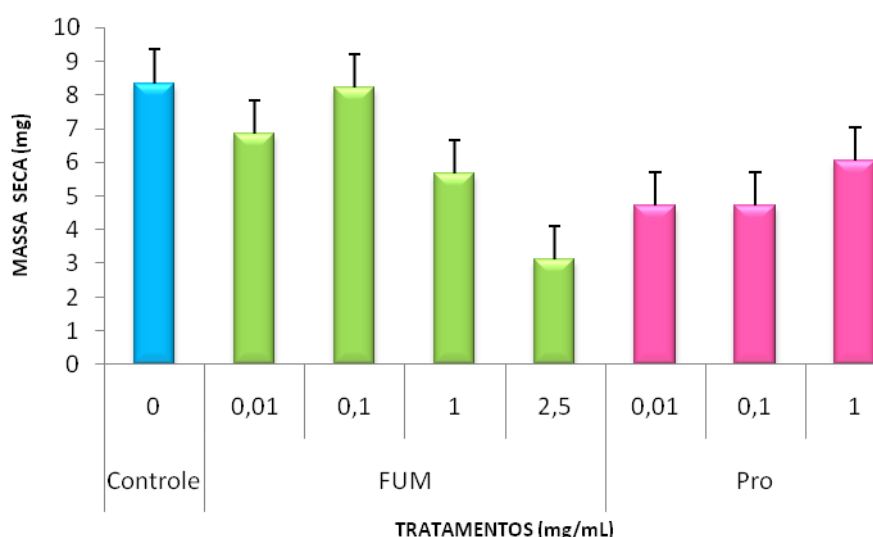


Figura 6. Valores médios da massa seca de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dos padrões ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris*. Plântulas com dez dias de idade.

Segundo Reigosa *et al.* (1999) cada processo fisiológico tem resposta diferente a certas doses de cada aleloquímico em particular. Porém segundo Ferreira e Áquila (2000) esses efeitos visíveis dos compostos sobre as plântulas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores ao nível molecular e celular. Estas alterações podem ser pontuais, mas como o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo *feedback*, rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos.

Por apresentarem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos (auxinas, giberelinas, citocininas, retardadores, inibidores e etileno), é possível que os aleloquímicos testados de *C. verticillaris* tenham função fitorreguladora, ou que eles ajam como fonte de nutrientes para as plântulas de *L. sativa*. Porém, mediante todos os resultados observados, é mais provável que estejam agindo como biorreguladores do crescimento uma vez que esses reguladores alteram o nível dos hormônios naturais da planta ou interferem na sua resposta, apresentando efeitos como diminuição do crescimento da planta, inibição do processo germinativo das sementes como também em outras fases do crescimento como a embriogênese (Carvalho e Nakagawa, 2000). Contudo, apesar do crescimento acelerado das radículas, é provável que as plântulas em condições naturais não se desenvolvam, por apresentarem radículas muito grandes e área foliar pequena, decorrente de alguns tratamentos (FUM 2,5 e 0,1mg/mL). Isto pode impedir a realização da fotossíntese.

Yano *et al.* (1994) também obtiveram resultados de estímulo semelhantes ao analisar a bioatividade do FUM sobre os comprimentos médios da radícula da cebola. Gardner e Mueller (1981) citam o ácido FUM como uma substância inativa na germinação de sementes, todavia não mencionam nenhum efeito ao estímulo do crescimento. Asahina e Shibata (1954), Vicente (1975) e Hale (1983) declaram que os compostos liquênicos são em sua maioria insolúveis em água, no entanto, Iskandar e Syers (1971), Ascaso e Galvan (1976) afirmam que o FUM constitui umas das substâncias liquênicas mais solúveis em água. Isto provavelmente ocorre quando a substância percolada para o solo, forma complexo com íons nele presentes. Caso contrário, esse composto não conseguiria ser absorvido pelas plântulas e não promoveria os efeitos aqui relatados. Há estudos conferindo ao FUM atividade antiherbivoria (Reutimann e Scheidegger, 1987) e antineoplásica (Santos *et al.*, 1999).

Resultados de estímulo de outros compostos liquênicos como o ácido tetrônico de *Sticta coronata* foram relatados por Ibi *et al.* (1979). Também existem relatos de propriedades de inibição desses organismos sobre vegetais. Os depsídeos (ácidos barbático e lecanórino) e o tridepsídeo (ácido girofórico) foram relatados como inibidores do transporte de elétrons fotossintéticos em cloroplastos isolados (Ellis *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2000). Segundo Romagni *et al.* (2004), a atividade *in vitro* do ácido úsnico é superior em determinados sítios de ação quando comparada a outros inibidores sintéticos como herbicidas.

Quanto à caracterização de pH obtida para os padrões de *C. verticillaris*, pode-se notar que os valores variaram entre 4,5 e 6,0 indicando baixa acidez, estando esses valores dentro do que se considera adequado para a germinação e desenvolvimento de *L. sativa* (Chou e Young, 1974; Baskin e Baskin, 1998; Elakovich, 1999; Aquila, 2000). Assim, pode-se excluir uma interferência desse fator nos efeitos observados. Gardner e Muller (1981) observaram que o pH do FUM influenciava na germinação dos esporos de *Funaria hygrometrica*. Relataram que 97% germinavam quando submetidos aos valores de pH 6, 7 e 8 e, 41% em pH 5. Contudo, esse resultado não foi reproduzido neste trabalho com aquênios de *L. sativa*, no qual foi observado que este ácido não influenciou o processo germinativo, demonstrando sensibilidade da espécie ao pH e não ao composto.

Ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Fig. 7) demonstram a pureza das substâncias teste. O PRO (fig. 6A) apresentou tempo de retenção de 3,92 minutos e o FUM 4,15 minutos (Fig. 6B). O pico registrado no tempo de retenção médio de 2,7 minutos foi identificado como o metanol, usado como solvente de eluição das amostras. A tabela 2 sumariza os dados quantitativos dos cromatogramas.

Erros inerentes à calibração direta foi estimada pelo desvio padrão, resultante de injeções com três repetições para cada concentração das substâncias purificadas. A equação da reta, obtida por regressão linear, apresentou r^2 abaixo de 1, para ambos os compostos (Fig. 8).

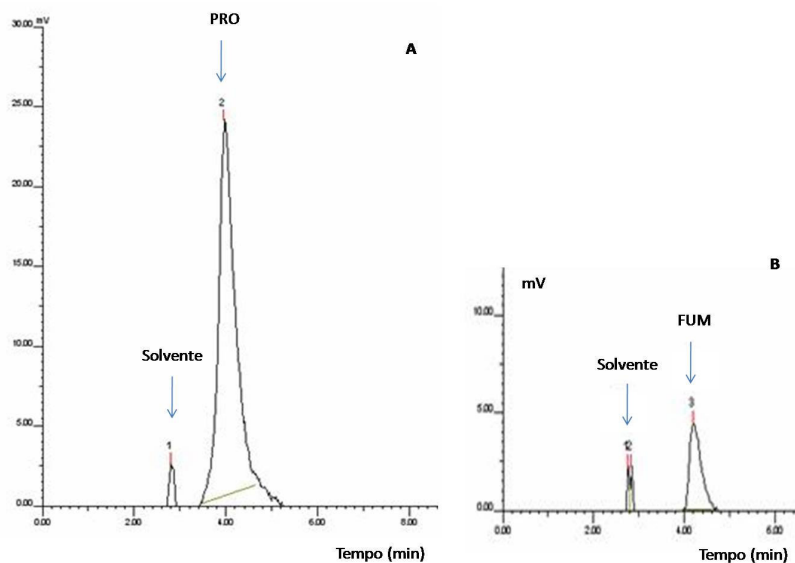


Figura 7. Cromatogramas de cromatografia líquida de alta eficiência dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*. **A.** Ácido protocetrárico (PRO). **B.** Ácido fumarprotocetrárico (FUM).

Tabela 2. Resultado das análises dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência

EXTRATO	TR	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	
FUM	2,72	9,533	Solvente	
	2,78	5,742		
	4,157	80,168	6,713	FUM
PRO	2,7655	18,642	Solvente	
	3,9270	581,299		
			1,721	PRO

Apesar do FUM e PRO serem substâncias majoritárias em *C. verticillaris* (Ahti *et al.*, 1993; Pereira, 1998), é provável que elas não sejam as responsáveis pelos severos efeitos (clorose, oxidação radicular, elevadas inibições do crescimento) observados pelos extratos no crescimento (Tigre *et al. in press*). É possível, ainda, que elas atuem em sinergismo com outras substâncias não identificadas pelas técnicas utilizadas, ou ainda que esses efeitos sejam atribuídos a essas substâncias. Contudo, visto que o FUM é purificado a partir do extrato acetônico e que esse produziu em trabalhos anteriores elevadas induções no crescimento de *L. sativa* (Tigre *et al. in press*), é possível inferir que esse composto seja o promotor dos efeitos observados, já que esse também foi encontrado em concentrações significativas nesses extratos.

Futuros experimentos sobre outros mecanismos de ação desses compostos poderão contribuir para um conhecimento ainda mais específico da espécie. Diante disso, essas substâncias poderão ser utilizadas como produtos biofertilizantes ou biorreguladores.

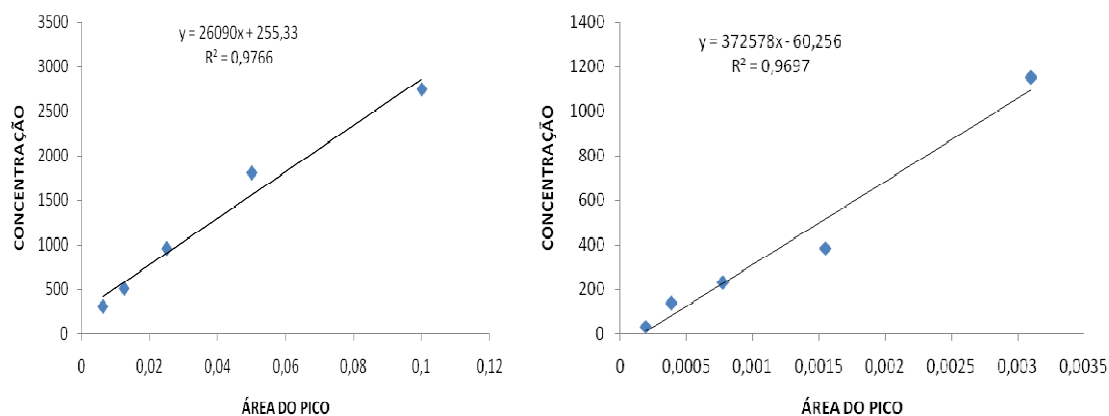


Figura 8. Curvas de calibração dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) obtidas por CLAE. Calibração direta do FUM: $y = 26090x + 255,33$; $r^2 = 0,9766$ e do PRO: $y = 372578x - 60,256$; $r^2 = 0,9697$. Dados resultantes de três replicatas.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida e ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a E. C. Pereira.

REFERÊNCIAS

- Ahti, T. 1993. Cladoniaceae. In: W. Greuter [ed.], Names in current use in the families Trichocomaceae, Cladoniaceae, Pinaceae, and Lemnaceae. **Regnum Vegetabile 128**: 58–106.
- Aloni R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany 97**: 883-893.
- Aqüila, M.E.A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia, Série Botânica 53**: 51-66.

- Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokyo. Japanese Society Promotion of Science.
- Ascaso, C.; Galvan, J. 1976. Studies on the pedogenetic action of lichen acids. **Pedobiologia** 16 (5): 321-331.
- Balke, N.E. 1985. Effects of allelochemicals on mineral uptake and associated physiological processes. **ACS Symposium Series** 268: 161-178.
- Baskin, C.C.; Baskin, J.M. 1998. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. New York: Academic Press, 666 p.
- Benicasa, M.M.P. 1988. **Análise de crescimento da plantas**. FUNEP, Jaboticabal.
- Bradow, J.M.; Connick, W.J. 1990. Volatile seed germination inhibitor from plant residues. **Journal of Chemical Ecology** 16: 645-666.
- Bradow, J.M. 1991. Relationships between chemical structure and inhibitory activity of C6 through C9 volatiles emitted by plant residues. **Journal of Chemical Ecology** 17: 2193-2212.
- Brasil. 1992. **Regras para análise de sementes**. SNDA/DNDV/CLAV, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 588p.
- Chou, C. H.; Young, C. C. Effects of osmotic concentration and pH on plant growth. **Taiwania**, v. 19, n. 2, p. 157-165, 1974.
- Cruz-Ortega, R.; Anaya, A.L.; Hernández, B.E.; Laguna, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology** 24: 2039-2057.
- Dawson, H.J, Hrutfiord, B.F, Ugolini, F.C. 1984. Mobility of lichen compounds from *Cladonia mitis* in arctic soils. **Journal of Soil Science** 138: 40-45.
- Duke S., O. 1990. Natural pesticides from plants. In: Janick, J., and J. E. Simon (eds). **Advances in New Crops**. Timber Press, Portland, OR. pp: 511-517.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M.; Schrader, K.K.; Aliotta, Q.; Oliva, A.; Romagni J.G. 2002. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science** 50: 138-151.
- Edmond, J.B.; Drapala, W.J. 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of the Society for Horticultural Science** 71: 428-434.

- Einhellig, F.A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. Pp. 171-188. In: A.R. Putnam & C.H.-S. Tang (eds.). **The Science of Allelopathy**. Nova York, John Wiley and Sons.
- Elakovich, S.D. 1999. Bioassays applied to allelopathic herbaceous vascular hydrophytes. Pp. 45-56. In: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; FOY, C.L. (Ed.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press.
- Ellis, M.K.; Whitfield, A.C.; Gowans, L. A.; Auton, T. R.; Provan, W.M.; Lock, E.A.; Smith, L.L. 1995. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonyl-benzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. **Toxicology and Applied Pharmacology 133**: 12-19.
- Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed Editora, S.A., 323 p.
- Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12**: 175-204.
- Follman, G.; Peters, R. 1966. Flechtenstoffe und Bodenbildung. **Z. Naturwissenschaften 21**: 386-387.
- Gardner, C.R.; Mueller, D.M.J. 1981. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. **American Journal of Botany 68** (1): 87-95.
- Hale-Jr., M.E. 1983. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 90p.
- Ibi, A.; Tanniguchi, E.; Maekawa, K. 1979. Syntheses and biological activities of tetrone substances in the genus *Cladonia*. **Annales Botanici Fennici Helsinki 23**: 173-188.
- Inderjit, Dakshini, K.M.M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review 61**: 28-44.
- Inderjit. 1996. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review 62**: 186-202.
- Iskandian, I.R.; Syers, J.I. 1971. Solubility of lichen compounds in water: pedogenetic implications. **Lichenologist 5**: 45-50.
- Jacobi, U. S.; Ferreira, A. G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimacronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 26** (7): 935-943.
- Labouriau, L.G. 1983. **A germinação de sementes**. OEA, Washington, DC.
- Lorteau, M.A. ; Ferguson, B.J. ; Guinel, F.C. 2001. Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. **Physiologia Plantarum 112**: 421-428.

- Lovett, J.V.; Ryuntyu, M. 1992. Allelopathy: broadening the context. Pp. 11-19. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. (Ed.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. **Crop Science** 2: 176-177.
- Pereira, E.C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese Doutorado em Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.
- Ravinskaya, A.P.; Vainshtein, E.A. 1975. Effect of some ecological factores on the contento f lichen substances. **Ekologia** 6 (3): 82-85.
- Reigosa, M.J.; Sanchez-Moreiras, A. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** 18: 877-608.
- Reutimann, P.; Scheidegger, C. 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. **Journal of chemical ecology** 13 (2): 363-369.
- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. 2nd. New York, Academic Press.
- Romagni, J.G.; F.E. Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Pp. 13-33. In: Macias, F.A. (Ed.). Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. In **allelopathy**. CRC press LLC, Boca Raton, Fla.
- Rojas, I.S.; Lotina-Hennsen, B.; Mata, R.; 2000. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Natural Products** 63: 1396-1399.
- Santos, L.C.O.; Cangussu, M.S.T.; Batista, O.P.; Santos, J.P. 2009. Oral cancer popultion sample of the state of Alagoas at a reference hospital. **Brazilian Dental Journal** 75 (4): 524-29.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Trad. Eliana Rebonato Santarém et al., Porto Alegre: Artmed editora, 719 p.
- Tejeda-Sartorius, O.; Rodríguez-González, M. T. 2008. Inhibidores de germinación y crecimiento de maleza y hortalizas, en residuos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). **Agrociencia** 42: 415-423.
- Tolpysheva, T.Y. 1984. Effects of lichen extracts on fungi. I. Effects of aquous extracts of *Cladina stellaris* and. *C. rangiferina* in the growth of sll fungi. **Mycological Pathology** 18 (4): 297-293.
- Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las sustancias liquênicos**. 1. Ed. Madrid. Alhandra S.A., 162p.

- Yano, A. M. 1994. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula *Allium cepa***. 126f. Dissertação. Curso de Mestrado em Criptógamos. Departamento de Micologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.

CONCLUSÃO

1. Os resultados do presente trabalho indicam a presença de efeitos alelopáticos, promovidos pelos extratos, substância purificada (FUM e PRO) e talos de *C. verticillaris*.
2. Foram observados efeitos de inibição e estímulo do crescimento tanto no bioensaio de germinação quanto no de crescimento.
3. A intensidade dos efeitos observados variaram de acordo com a concentração. Os efeitos mais severos foram observados pelos tratamentos nas maiores concentrações.
4. A germinabilidade dos aquênios de *L. sativa* não foi influenciada por *C. verticillaris*, mas alterou a curva do tempo de germinação.
5. A radícula mostrou-se mais sensível a presença dos aleloquímicos, alterando a absorção de nutrientes e conseqüentemente afetando a biomassa das plântulas.
6. Foram evidenciadas alterações morfológicas como modificações na formação de pêlos radiculares, raízes laterais, aumento do diâmetro e hipertrofia do eixo hipocótilo-radícula, demonstrando alterações no balanço hormonal das plântulas.
7. Evidenciou-se a presença de FUM e PRO nas amostras por CLAE, indicando grandes probabilidades de serem os promotores das atividades observadas.
8. Os resultados indicam que *C. verticillaris* possui substâncias que podem agir como herbicidas naturais.

RESUMO

Os aleloquímicos líquênicos, têm um importante papel na ecologia dos líquens, podendo afetar o desenvolvimento de outros organismos ao seu redor. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático do talo de *Cladonia verticillaris*, seus extratos e suas substâncias principais, os ácidos fumarprotocetrárico (FUM) protocetrárico (PRO) sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*. Os extratos foram obtidos com éter dietílico, clorofórmio e acetona. O FUM foi extraído a partir do extrato acetônico. Ensaios cromatográficos foram realizados para detecção dos fenóis. O experimento foi conduzido em placas de Petri contendo extratos, ou FUM ou PRO (0,01; 0,1; 1,0; 2,5mg/mL). Nos bioensaios *in vivo* foram borrifadas soluções de uréia (0,1; 1,0 e 10mg/mL) sobre o líquen. Observou-se que o talo e todas as soluções testadas não afetaram a germinabilidade, mas os extratos causaram alterações no tempo de germinação. Os parâmetros biométricos foram mais sensíveis aos aleloquímicos obtendo-se diferentes respostas dependendo da concentração. As alterações morfológicas das plântulas indicaram modificações no balanço hormonal das plântulas, com indução da formação de pêlos, raízes laterais, aumento do diâmetro radicular e inibições do sistema radicular. Notou-se que a adição de uréia (0,1mg/mL) e água deionizada ativa a urease causando diferentes efeitos alelopáticos. As análises cromatográficas revelaram a presença de FUM e PRO nos extratos indicando serem estas as substâncias responsáveis pelas alterações observadas.

ABSTRACT

The lichen allelochemical have important role of these organisms, affecting the development of other organisms around them. The objective of this work was to evaluate the allelophatic potential of *Cladonia verticillaris* thallus, their extracts and main compounds, the fumarprotocetraric (FUM) and protocetraric (PRO) acids on the germination and initial development of *Lactuca sativa*. The extracts were obtained with diethyl ether, chloroform and acetone. The FUM was isolated from acetone extract. Chromatographic assays were carried out for phenolic detection. The experiment was conducted in Petri dishes containing the extracts, or FUM, or PRO (0,01; 0,1; 1,0; 2,5mg/mL). In the *in vivo* bioassays, urea solutions (0,1; 1,0 e 10mg/mL) were sprayed over the lichen thalli. It was observed that the thallus and all tested solutions did not affect the germinability, but the extracts caused alterations on germination time. The biometric parameters were most sensible to allelochemicals, showing different responses, depending on the concentration. Morphological alterations of seedlings indicated modifications on hormonal balance of seedlings, inducing hairs formation, side roots, enlargement of root diameter, and inhibition of this system. It was observed that urea addition (0,1mg/mL) and deionized water activates the urease, causing different allelophatic effects. The chromatographic analysis revealed the presence of FUM and PRO in the extracts, indicating to be those compounds the responsible for the observed alterations.

ANEXOS



Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*

R.C. Tigre^a, N.H. Silva^b, M.G. Santos^c, N.K. Honda^d, E.P.S. Falcão^e, E.C. Pereira^{f,*}

^a Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Department of Botany, Laboratory of Plant Ecophysiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Department of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

^e Center for Nutrition, Academic Center of Victoria—CAV, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^f Department of Geographical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50.740-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2012

Received in revised form

28 June 2012

Accepted 29 June 2012

Available online 25 July 2012

Keywords:

Allelopathy

Fumarprotocetraric acid

Lichen

Natural herbicide

Protocetraric acid

ABSTRACT

Responses to germination and initial growth of *Lactuca sativa* (lettuce) submitted to organic extracts and purified compounds of *Cladonia verticillaris* (“salambaia”) were analyzed in this work. The experiments were conducted in laboratory conditions using extracts and pure compounds at different concentrations. None of the assays showed any influence on the germination of *L. sativa* seeds using *C. verticillaris* extracts; however, modifications in leaf area and seedling hypocotyl and root development occurred. In the growth experiments, seedlings exposed to ether or acetone extract showed diminished hypocotyl growth in detriment to the root stimulus, compared to controls. Increases in extract concentrations led to the formation of abnormal seedlings. To determine the allelochemicals of *C. verticillaris*, its principal components, fumarprotocetraric and protocetraric acids, were isolated and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). When the seedlings were exposed to the two acids separately, presented increased leaf area at all concentrations. In contrast, hypocotyl and root stimulus was observed only in the presence of protocetraric acid at different concentrations. Fumarprotocetraric as well as protocetraric acids, isolated and purified from *C. verticillaris* and *Parmotrema dilatatum* respectively, influenced the development of *L. sativa* seedlings at high concentrations, indicating a possible bioherbicide potential of these acids.

Crown Copyright © 2012 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The search for new allelochemicals is based on plants and seeds resistance, tolerance, or sensibility to several compounds. The use of secondary metabolites in this context is justified due to their specific action mechanism on some species, and sensitivity showed by others like *Lactuca sativa* (lettuce) and *Solanum lycopersicum* L. (tomato), whose usefulness is known (Ferreira and Áquila, 2000).

Over the last few decades, interest has grown concerning compounds possessing allelopathic properties (Mallik, 2000;

Young and Bush, 2009), which could lead to the discovery of natural herbicides that act directly on the weeds and do not cause environmental damage (Quayyum et al., 2000; Haig et al., 2009). The principal stimulus for conducting these studies is to reduce the use of traditional herbicides, diminishing the costs of agricultural production and the resulting environmental impact of their use, and helps to explain the phenomenon of allelopathy between the biological entities. It is known that *Cladonia verticillaris* has influence on soil fertility and the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (Silva, 2007), but little is known about the relationship between lichen species, soil and adjacent biota. Assessment of this relationships and its possible allelopathic effects would be important to a greater understanding of the interaction between organisms in its ecosystem.

The competition generated by the growth of weed in commercial crop cultivation areas influences the development of this culture, reducing its productivity and the final quality of the product (Quayyum et al., 2000). There are numerous natural bioactive compounds with unexplored properties and the discovery of the sites of action would aid the identification of new herbicide molecules (Duke et al., 2002). One way of reducing

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; FUM, Fumarprotocetraric acid; GVI, Germination velocity index; HPLC, High performance chromatography; MT, Mean time; PRO, Protocetraric acid; Rf, Retention factors; TLC, Thin layer chromatography; UV, Ultraviolet radiation

* Corresponding author. Fax: +55 81 2126 8275.

E-mail addresses: biotigre@gmail.com (R.C. Tigre), nhsilva@uol.com.br (N.H. Silva), mauroguida@yahoo.com.br (M.G. Santos), nkhonda@nin.ufms.br (N.K. Honda), emerson_falco@yahoo.com.br (E.P.S. Falcão), eugenia.pereira@pq.cnpq.br (E.C. Pereira).

herbicide use is the identification of genes responsible for the allelopathic effects; however, prior work to identify species with allelopathic potential is required. Research in this area has immense importance to optimize production systems that are environmentally correct and economic, through the reduction of herbicide applications (Haig et al., 2009). Brazil is the fifth largest consumer of agro-toxics worldwide, with a yearly consumption of 150,000 t, of which 33% are herbicides (IBGE, 2009).

Natural products are sources of a number of pesticides, used directly as crude extracts or pure compounds (Dayan et al., 2000). However, instead of being used directly, many are used to identify active ingredients and the development of pesticides from natural products. Numerous examples exist of such natural products used as fungicides, insecticides and even herbicides (Duke et al., 2002).

Extracts used in bioassays for preliminary diagnosis of allelopathy are mixed with several substances that can exert additive or synergistic effects, making analysis of the action of each substance. However, allelopathic effects are commonly due to the synergistic activity of several allelochemicals rather than isolated compounds (Quayyum et al., 2000).

Lichen metabolites exhibit a variety of allelopathic effects (Marante et al., 2003; Romagni et al., 2004; Campos et al., 2008). This action is particularly important in the defense of these organisms against attack by both herbivores and micro-organisms, which could suggest applications in several areas of agriculture.

Lichen phenolics occur as insoluble crystals, found in cortical tissues, over the photobiont layer, in medullar inner tissues, or yet in specific vegetative and reproductive structures. This way, in initial prospecting studies for obtaining a more realistic evaluation of lichen potentiality as allelopathic agent, would be appropriate extract both cortical and medullar compounds. This way, the use of solvents with different polarities is necessary, due the affinity of substances with different solvents and their extraction capacity.

Another important consideration for bioassays with allelopathic action is the selection of target-species. The commonest model used for weeds is *Lactuca sativa* L., due to its fast germination, uniformity and sensibility (Einhelling and Rasmussen, 1979; Ferreira and Áquila, 2000). According to Dayan and Duke (2006), these characteristics are essential for data obtention without undesirable delays. The objective of these assays is to find substances for weeds control, but the use of these species presents some limitations as not uniform germination, due to

the low diaspores homogeneity, unlike what occurs when used species cultivated in commercial scale (Silva et al., 2009).

C. verticillaris (Raddi) Fr. is a lichen that grows on sandy soil of tablelands relieve with savannah-like vegetation. It is endemic in the east coast of Brazil, and also occurs in some habitats in the interior of Pernambuco state, Brazil (Fig. 1). Studies demonstrate that this species liberates its metabolites to the subjacent soil, interacting with the nutrient cycles (Vasconcelos, 2009) and modifying the chemical composition of the soil substrate (Silva, 2007). Given the interaction of this species with the substrate, this work aimed to analyze the allelopathic and bioherbicidal potential of extracts and pure compounds of *C. verticillaris*, and their effect on the germination and initial growth of *L. sativa*.

2. Material and methods

2.1. Plant material, collection area and chemical procedures

The study was conducted using lettuce seeds (*L. sativa*) or seedling cultivated from these in 9 cm diameter Petri dishes lined with previously autoclaved filter paper, maintained in a BOD growth chamber, Nova Técnica, NT708, Piracicaba, SP, Brazil. Three experiments named A, B and C were conducted; in all of them, the seeds or seedlings were maintained in contact with organic extract or isolated and purified compound from *C. verticillaris* the fumarprotocetraric acid (FUM), or protocetraric acid (PRO) from *Parmotrema dilatatum*. The lichen was collected in the municipality of Saloá, 273 km (170 mile) from Recife, PE. The material was dried at room temperature ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) and ground to a powder. The dry, ground materials were submitted to serial extraction in a soxhlet apparatus with ether, chloroform and acetone, according to the elutropic series (organic extracts). The solvents were obtained by fine chemical Vetec LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brazil. For every 2.0 L of each solvent, 150 g of lichen material was used. After extraction, the materials were filtered and vacuum evaporated.

2.2. Isolation and purification of fumarprotocetraric (FUM) and protocetraric acids (PRO)

The principal compound of *C. verticillaris*, FUM, was isolated and purified from the acetone extract. After evaporation of the solvent, the extract was washed 4 times in a G-4 porosity funnel with acetone, as originally described by Pereira (1998). PRO was isolated from *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale using dichloromethane followed by acetone at 45°C . The solvents were obtained by Merck KGaA, Darmstadt, Germany. The extracts were purified by successive acetone treatments and centrifugation. Confirmation of compounds structure was performed by analysis of ^1H , ^{13}C and DEPT-135 nuclear magnetic resonance spectra, Bruker DPX-300, SP, Brazil.

2.3. Thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC)

Thin layer chromatography (TLC) assays were performed for qualitative detection of the substances contained in the organic extracts. The extracts and purified compounds were applied to Merck silica gel F₂₅₄+366 chromatoplates developed in unidimensional solvent system B (hexane/diethyl ether/formic acid, 130:80:20, v/v), according to Culberson's methodology (1972). The spots were revealed by 10% sulfuric acid pulverization, and plates heating at 100°C , followed by visualization under short (256 nm) and long (366 nm) wavelength UV light. The results were evaluated by calculation of the retention factors (Rf), determined for the different spots.

Organic extracts and purified compounds were also analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Hitachi liquid chromatography (655 A-11, Tokyo, Japan) coupled to an detector (CG437-B) UV set at 254 nm, using a C-18 reverse phase column MicroPack MCH-18 de 300×4 mm, Berlin, Germany. The mobile phase consisted of methanol, deionized water, acetic acid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in the proportion 80:19.5:0.5 v/v, a flow rate of 1 mL min^{-1} , 0.04 attenuation and at room temperature ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), according to the methodology described by Legaz and Vicente (1983). Dry residues were dissolved in methanol at 0.01 g dm^{-3} and injected onto a column. Quantization of FUM and PRO was achieved by injecting purified compounds (FUM and PRO) as standards for calibration lines.

2.4. Experiment A

The objective of this experiment was to test whether the lichen extract exerted any effect on germination (pre-emergence) of lettuce seedlings. The bioassay was



Fig. 1. *C. verticillaris* thallus collected in Saloá-PE, Brasil in its natural habitat (A); details of the thallus (B).

conducted in a BOD germination chamber with a photoperiod of 12 h and temperature alternating between 23 and 27 °C (night and day). In each plate, the filter paper was moistened with 6.0 mL of each extract at 0.01, 0.1, 1.0, 2.5 and 5.0 g dm⁻³. Controls were obtained using distilled water. After solvent evaporation, in a flux chamber for 12 h, the filter papers were moistened with 6.0 mL of distilled water, maintaining the initial concentrations. The treatments were randomized, with four repetitions of 50 *L. sativa* seeds per plate. The germination rate was verified every 12 h for 7 day, permitting evaluation of the first counts on day 4, total germinability, mean time (MT), the germination velocity index (GVI) and biometry (hypocotyl-root length and dry mass), according to the respective methodologies of Brasil (1992), Labouriau (1983), Silva and Nakagawa (1995) and Maguire (1962). Leaf area (length X width) was also analyzed. Seedlings were considered to have germinated when they presented 2 mm of root protrusion and were further classified as normal or abnormal, according to the specifications of Brasil (1992).

2.5. Experiment B

This experiment aimed to evaluate the effect of different concentrations of the organic extracts on the initial development of *L. sativa* seedlings. Thus, lettuce seeds were germinated in Petri dishes, under the same conditions described in experiment A, though hydrated only with distilled water. Following germination, 10 plant seedlings were transferred to similar plates containing water solutions of the organic extracts at the same concentrations as experiment A. These plates were sealed and incubated in a BOD chamber at 25 °C using a photoperiod of 12 h for 10 day. After this period, the hypocotyl-root axis and leaf area (length X width) were measured. The seedlings were also characterized as normal or abnormal according to Brasil (1992) and the dry weight for each treatment was calculated.

2.6. Experiment C

The objective of this experiment was to determine whether fumarprotocetraric (FUM) and protocetraric (PRO) acids, the principal components of *C. verticillaris*, acted as allelochemicals of the species by interfering in the germination and initial development of *L. sativa*. Bioassays were conducted in a similar way to experiments A, where seeds germinated in the presence of FUM or PRO, and B, where seeds germinated in water and later transferred to solutions of FUM or PRO. To each plate 3.0 mL of FUM or PRO at 0.02, 0.2 and 2.0 g dm⁻³ were added.

2.7. Statistical analyses

All the experiments were conducted entirely randomly with four repetitions. The means were submitted to analysis of variance (ANOVA). When differences were detected, the Tukey test was performed with significance determined at a level of 5%.

3. Results

The mean time of germination (MT) varied as a function of extract concentration (Fig. 2). All the extracts at 0.01 g dm⁻³ promoted increased vigor in the *L. sativa* seedlings. Although this concentration was the lowest tested, the results do not represent a dose-reduction model, since the ether extracts at concentrations of 1.0 and 2.5 g dm⁻³ also diminished the mean germination time; however, the ether extract at 5.0 g dm⁻³ and the chloroform extract at 2.5 g dm⁻³ promoted a delay in germination (increased MT), consequently diminishing seedlings vigor. Despite to these differences, final germinability (180 h) and the first count (96 h) were not affected by the *C. verticillaris* extracts at all five concentrations tested.

Acetone extract of 2.5 g dm⁻³ reduced leaf area by 44.15%, while chloroform extract of 0.1 g dm⁻³ stimulated this parameter by 66.69% (Fig. 3A). The difference between the greatest inhibition and stimulation values was 198%. Chloroform (0.01 and 0.1 g dm⁻³) and acetone extracts (0.01 g dm⁻³) led to the accelerated development of eophylls and chloroform extract of 0.1 g dm⁻³ increased leaf thickness in seedlings of *L. sativa*. At 5.0 g dm⁻³, all the extracts induced the formation of a curled hypocotyl, characterizing the seedlings as abnormal (Fig. 4).

The extract concentration altered seedlings hypocotyl length, demonstrating that the extracts did not cause the same effect at

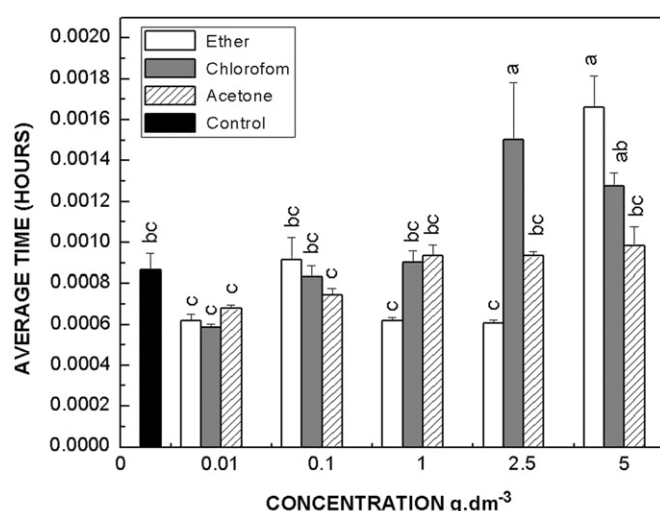


Fig. 2. Values for mean time of germination (180 h) of *L. sativa* L. seeds submitted to the action of different *C. verticillaris* extracts at five concentrations. Means followed by the same letter are do not differ from each another by the Tukey test ($p < 0.05$), means $\pm$ SE, $n=4$.

each concentration (Fig. 3B). Observation revealed that the acetone extract of 5.0 g dm⁻³ inhibited hypocotyl length of *L. sativa* seedlings by 47%, while ether extract promoted a 40% increase compared to controls; thus a difference of 164% occurred between these two treatments when analyzing the same concentrations.

The extracts showed action on root length according to the dose-stimulus model up to a concentration of 2.5 g dm⁻³, such that as the concentration increased so the growth induction increased (Fig. 3C). At 5.0 g dm⁻³, a drastic reduction in root length occurred. The greatest stimulus was caused by acetone extracts of 1.0 g dm⁻³ (146%) and 2.5 g dm⁻³ (138%) compared to controls. The strongest inhibition was caused by chloroform (81%) and ether extract (36%) at 5.0 g dm⁻³. However, seedlings dry mass at the end of the experimental period revealed no differences for any of the treatments ($p > 0.05$) compared to controls (Fig. 5).

When germinating the seeds in water and then transferring the seedlings to different lichen extracts, except ether (0.01 and 0.1 g dm⁻³) and acetone extract (0.1 g dm⁻³), all the extracts inhibited length leaf area up to 65.42% (Fig. 3D). The hypocotyl development was strongly diminished compared to controls ($p < 0.05$), principally when using ether and acetone extracts at most of the concentrations tested and when using chloroform extract at the two strongest concentrations (Fig. 3E). Moreover, all the extracts increased *L. sativa* root growth up to a concentration of 1.0 g dm⁻³ ($p < 0.05$), while at stronger concentrations, growth diminished (Fig. 3F). Root length was diminished ($p < 0.05$) when chloroform and ether extracts were added to the growth medium, reducing growth by 81% and 79%, respectively, five-fold shorter than controls.

Almost all the extracts promoted the development of secondary roots, which varied in size according to concentration (Fig. 6). Ether extract of 0.01 g dm⁻³ promoted the formation of only a few secondary roots. Observation verified that ether (0.01 and 0.1 g dm⁻³), acetone (0.01 g dm⁻³) and control treatments induced the development of long secondary roots, ether (1.0 g dm⁻³) and chloroform (2.5 g dm⁻³) treatments induced medium length secondary roots, while short secondary roots were induced by ether (2.5 and 5.0 g dm⁻³) and acetone (5.0 g dm⁻³) treatments.

Based on the color of spots detected by TLC and Rf values, it was only possible to confirm the presence of both FUM and PRO in the acetone extract. In contrast, HPLC analyses verified the

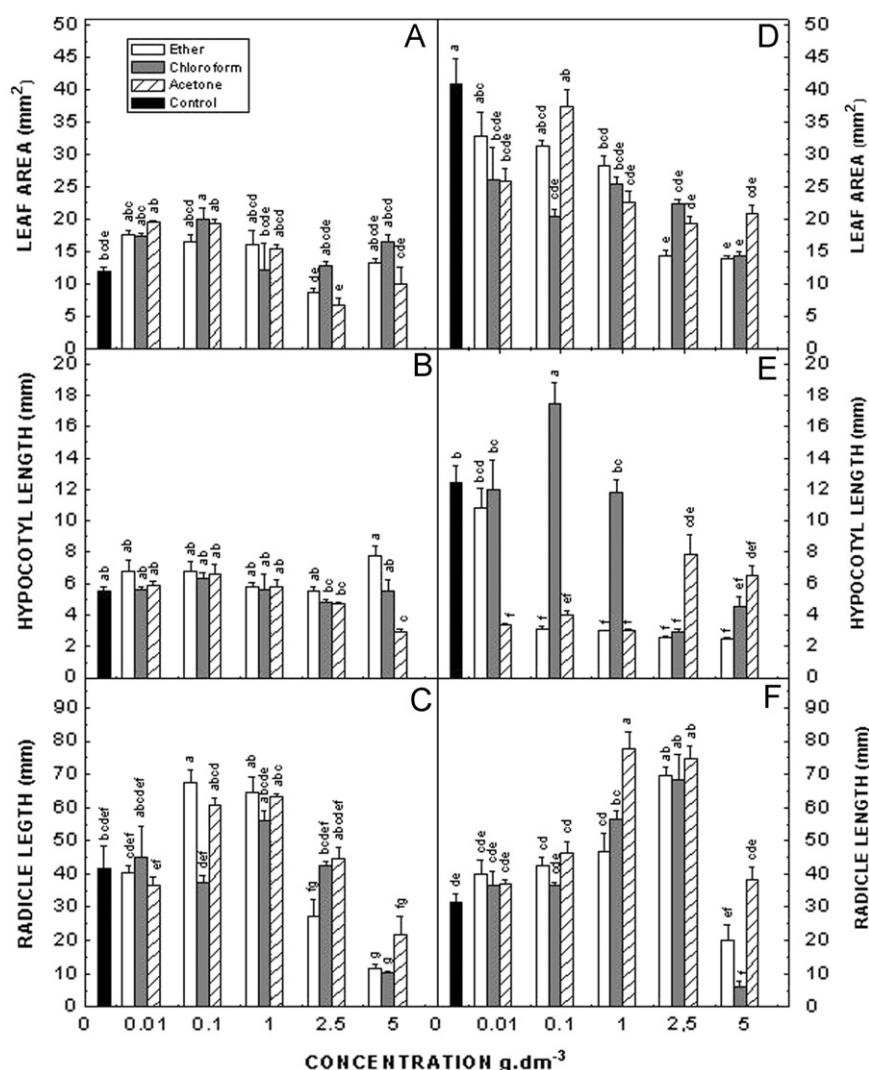


Fig. 3. Mean leaf area values (A, D), hypocotyl length (B, E) and root length (C, F) of *L. sativa* seedlings germinated (A–C), or transferred after germination in water (D–F), to solutions of different *C. verticillaris* extracts at five concentrations. The plant seedlings were evaluated 7 day after germination. Means followed by the same letter are do not differ from each another by Tukey test ($p < 0.05$), means $\pm$ SE, $n=4$.

presence of FUM and PRO in all the extracts and demonstrated high concentrations of PRO in the acetone extract (Table 1). Concentration of FUM was higher than concentration of PRO in both ether and chloroform extracts, whereas in acetone extract, concentration of PRO was higher than FUM.

Once the principal components of *C. verticillaris* (FUM and PRO) were the most abundant lichen phenolics in the extracts, they were isolated, and *L. sativa* seeds were placed in the presence of each compound separately in order to achieve germination. None of these compounds modified the germinability parameters: first count, GVI and mean germination time (data not shown).

Concerning the biometric parameters, the causes of variation (compounds versus concentration) differed in relation to the controls. When the seeds were placed in contact with FUM and PRO to germinate, growth of the seedlings and leaf area were inhibited compared to controls in the treatments with FUM (0.01 and 1.0 g dm^{-3}) and PRO (1.0 g dm^{-3}) (Fig. 7A), with no differences occurring in hypocotyl length ($p > 0.05$) (Fig. 7B). In contrast, root length was stimulated in different concentrations of both compounds (Fig. 7C). When the seeds were germinated in water and were transferred to different concentrations of these compounds, leaf area was increased in all treatments compared to

controls ($p < 0.05$) (Fig. 7D). Hypocotyl length was stimulated only in the presence of FUM (0.1 g dm^{-3}) and PRO (1.0 g dm^{-3}) treatments, presenting twice the size of controls (Fig. 7E), while root length was only stimulated in PRO treatment (0.1 g dm^{-3}) compared to controls ($p < 0.05$) (Fig. 7F).

Spectroscopic and HPLC assays confirmed the purity of the compounds used. PRO presented a retention time of 3.92 min and FUM of 4.15 min (Table 1). The peak registered at the mean retention time of 2.7 min was identified as methanol, used as solvent during the elution of the samples.

4. Discussion

Han et al. (2004) and Campos et al. (2008) list species of higher plants that present germination inhibition in contact with lichen extracts, which indicates a dependence of the species exposed to the extracts. The effects of the allelochemicals in different physiological processes are either directly dependent on the concentration or stimulation at low concentrations and inhibition at higher concentrations is expected (Reigosa et al., 1999). Moreover, the allelopathic effect does not affect germinability (the final

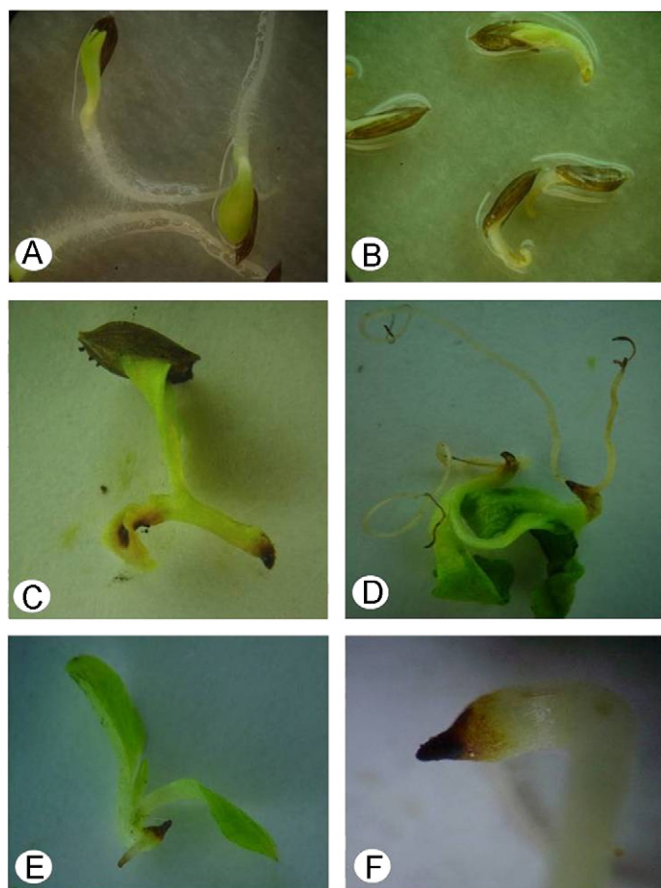


Fig. 4. *Lactuca sativa* seedlings submitted to organic extracts of *Cladonia verticillaris* ($5.0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). (A) Control. (B) Acetone extract treatment on seedlings for 3 day. (C) and (D) Acetone extract treatment on seedlings for 7 day. (E) Chloroform extract treatment on seedlings for 7 day. (F) Ether extract treatment on seedlings for 7 day.

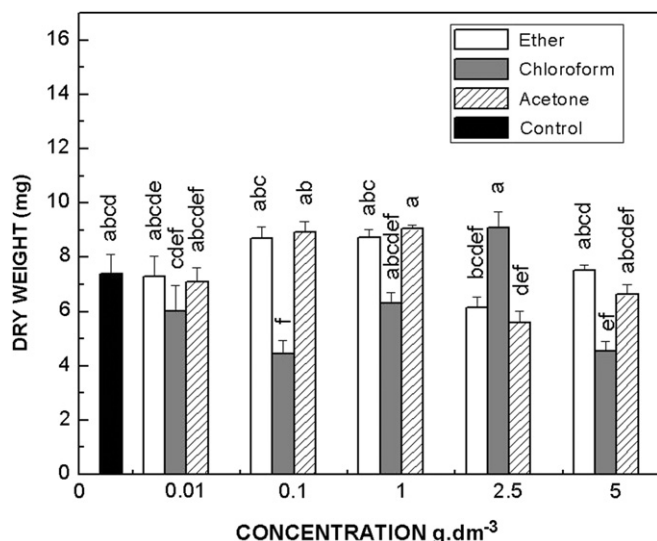


Fig. 5. Mean values of dry mass of *L. sativa* seedlings germinated in different *C. verticillaris* extracts at five concentrations and evaluated 7 day after germination. Means followed by the same letter are not differ from each another by the Tukey test ($p < 0.05$), means $\pm$ SE, $n = 4$.

percentage of germination), rather it affects the germination rate, provoking alterations in the germination distribution curve, extending the curve over a longer period (Ferreira and Áquila, 2000; Young and Bush, 2009). Alterations in the germination

curve could indicate interferences in the metabolic reactions that culminate in germination (Labouriau, 1983).

Regarding the growth of seedlings immediately after germination, not all allelochemical substances are inhibitors, they can be stimulants, like mineral nutrients, organic acids, carbohydrates and growth regulators (Tukey Junior, 1969). In studies involving higher plants, it has been observed that allelochemicals that naturally occur in *Eurycoma longifolia*, *Brucea* spp, *Quassia indica*, *Castela* spp and *Ailanthus* spp, are also phytotoxic and reduce *L. sativa* root growth (Dayan et al., 2000). Lichen-derived substances possessing direct toxic effects on higher plants have also been observed (Lechowski et al., 2006). Romagni et al. (2004) reported a group analog to lichen anthraquinones that inhibit the primary root formation of plants.

The damages observed in seedlings formation, root and seedling development are also described by Maraschin-Silva and Áquila (2006). Under the ether extract treatment, the larger roots were very fine and fragile, while under chloroform extract treatment the formation of very small secondary roots occurred, approximately 50% of which died. Darkening of the root coloration and fragility reveal damage, that indicates the action of toxic substances in the extracts (Maraschin-Silva and Áquila, 2006). Under the acetone extract treatment, darkening similar to necrosis occurred at the root apex from the onset of the experiment, while days later, at the apex, the development of very fine roots and secondary roots occurred. Given the reversibility of the alteration in coloration, in this case, the tissues could not be considered necrotic, suggesting the accumulation of phenols. From the onset of germination, observation revealed deformations and root curving in the seedlings submitted to extract concentrations of $5.0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. The distinct response to the extracts occurs because each physiological process has different responses to determined doses of each specific allelochemical (Cruz-Ortega et al., 1998; Reigosa et al., 1999).

Differential sensitivity to the inhibitors has been reported in several other studies (Barnes and Putnam, 1987; Peterson and Harrison, 1991). Generally, observation verified a more pronounced allelopathic effect on the initial development of a target plant seedlings when compared to germination, since the latter process uses the seeds own reserves. This dependency on the seed reserves means that germination is probably less susceptible to exogenous factors; moreover, it is possible that during the process in which the seeds were soaked, many of the allelochemicals were retained by the protective testa of the seed and did not penetrate in concentrations significant enough to interfere in seed expansion.

When analyzed, the extracts revealed the presence of two compounds. For acetone extract, a high concentration of FUM was verified (Table 1), together with trace concentrations of PRO, a hydrolysis of FUM. This result corroborates Pereira (1998), who emphasized that acetone is a good extractor solvent for lichen compounds due to its capacity to extract the substances at both the cortical and medullar level, thus, this solvent is routinely used in the extraction, isolation and purification of lichen compounds.

FUM and PRO separately can cause inhibition on leaf area (Fig. 7D), what can be related to photosynthetic alterations. Although, these compounds are also growth promoters of *L. sativa* seedlings (Fig. 7) may be acting as phyto-regulators, modifying the hormonal balance of these seedlings (data not analyzed). However, the highest inhibition effects are not explained for FUM or PRO action separately, but as a synergic action, that emphasizes the herbicide property, attributed to a combined action of FUM+PRO or FUM+PRO+unidentified substances.

It is likely that the compounds detected by HPLC are responsible for the allelopathic effects observed, or that these, depending on their concentrations, are acting in synergy with the

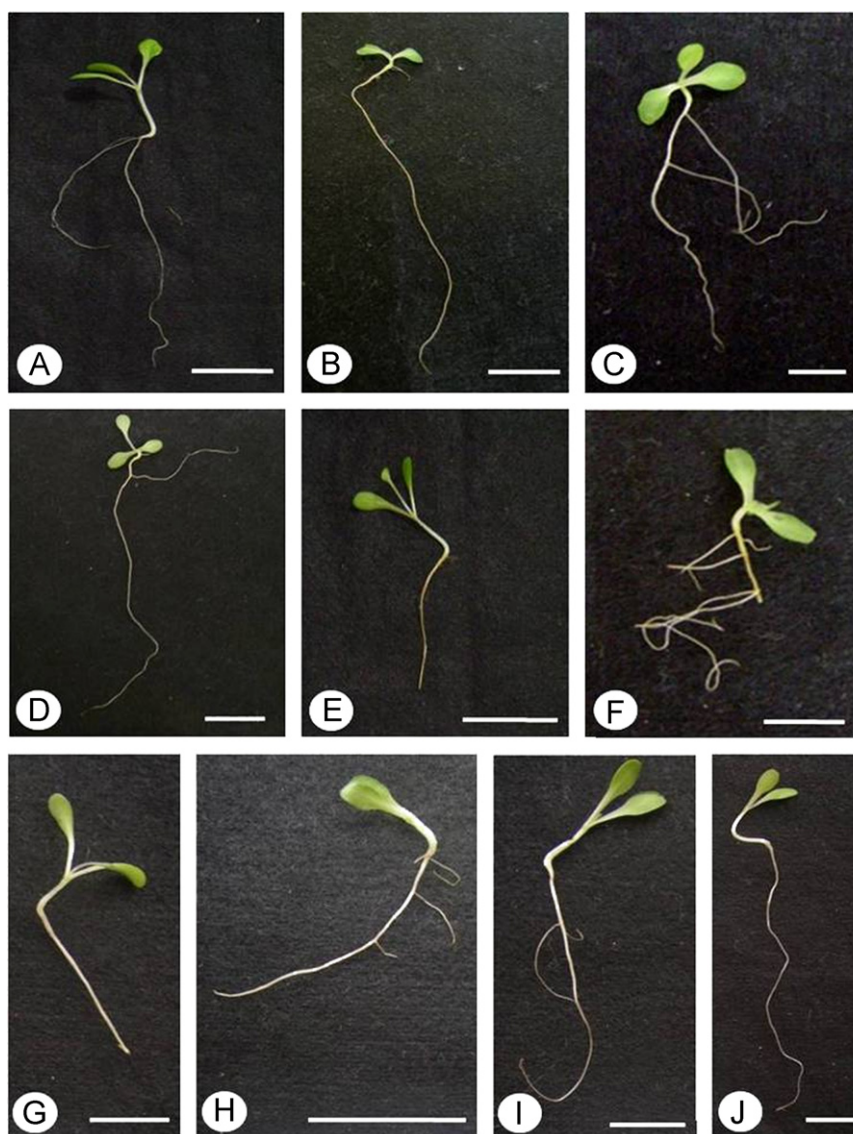


Fig. 6. *L. sativa* seedlings submitted to increasing doses of *C. verticillaris* organic extracts or to isolated FUM and PRO. (A) and (G), control; (B)–(F): Experiments of growth under treatment with organic extracts (G–J): Experiments of initial growth under treatment with FUM and PRO. (A): Control In (B): Acetone extract treatment at 1.0 g dm^{-3} . In (C): Ether extract treatment at 0.01 g dm^{-3} . In (D): Ether extract treatment at 0.1 g dm^{-3} . In (E): Acetone extract treatment at 5.0 g dm^{-3} . In (F): Chloroform extract treatment at 1.0 g dm^{-3} . (G): Control. (H)–(J): Experiments of initial growth under treatment with FUM and PRO. In (H): PRO treatment 0.01 g dm^{-3} . In (I): FUM treatment 0.01 g dm^{-3} . In (J): FUM treatment 0.1 g dm^{-3} . (Bar: (A–E)=2 cm; (F–J)=1 cm).

Table 1
Analysis of extracts from *C. verticillaris* submitted to high performance liquid chromatography (HPLC).

Extracts	$t_R(\text{min})$	Area counts (relative units)	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Compound
Ether	3.67 ± 0.08	831.81	2.39	PRO
Chloroform	3.65 ± 0.06	232.79	0.78	PRO
	3.92 ± 0.1	193.19	2.38	FUM
Acetone	3.60 ± 0.08	36,198.152	97.32	PRO
	4.02 ± 0.08	12.862	0.158	FUM

* Retention time.

substances verified by TLC. It is possible to hypothesize about the action of PRO and FUM as responsible for the allelopathic effects observed when used as isolated compounds or that their effect were due to the synergistic action with other compounds, or even more, with other substances not detected by the techniques used in this work. Einhellig and Rasmussen (1979) argued that a

minimal quantity of individual phenols could become relevant when their synergistic activity was demonstrated. Remains of *Pinus radiata* D. Don and *Eucalyptus lobulus* Labill inhibited the growth and development of *L. sativa*; the allelopathic effect was principally due to phenolic compounds (Souto et al., 1994). The extracts used in bioassays for a preliminary diagnosis of allelopathy are mixtures of several substances that can exert additive or synergistic effects; thus, analysis of the action of each compound in isolation is important.

In a study using pure compounds and acetone extracts of several *Cladonia* species on three moss species, complete inhibition of germination and spore growth was observed and toxicity was determined to be concentration and pH-dependent (Lawrey, 1995). The pH of the *C. verticillaris* extracts at a concentration of 5 g dm^{-3} presented values of 5.0 for the ether extract, 5.5 for chloroform and pH 6.0 for the acetone extract, which places them outside the limits prejudicial to the germination and development of *L. sativa* (3.0–7.0) (Baskin and Baskin, 1998). This could explain the non interference of the extracts on *L. sativa* germination.

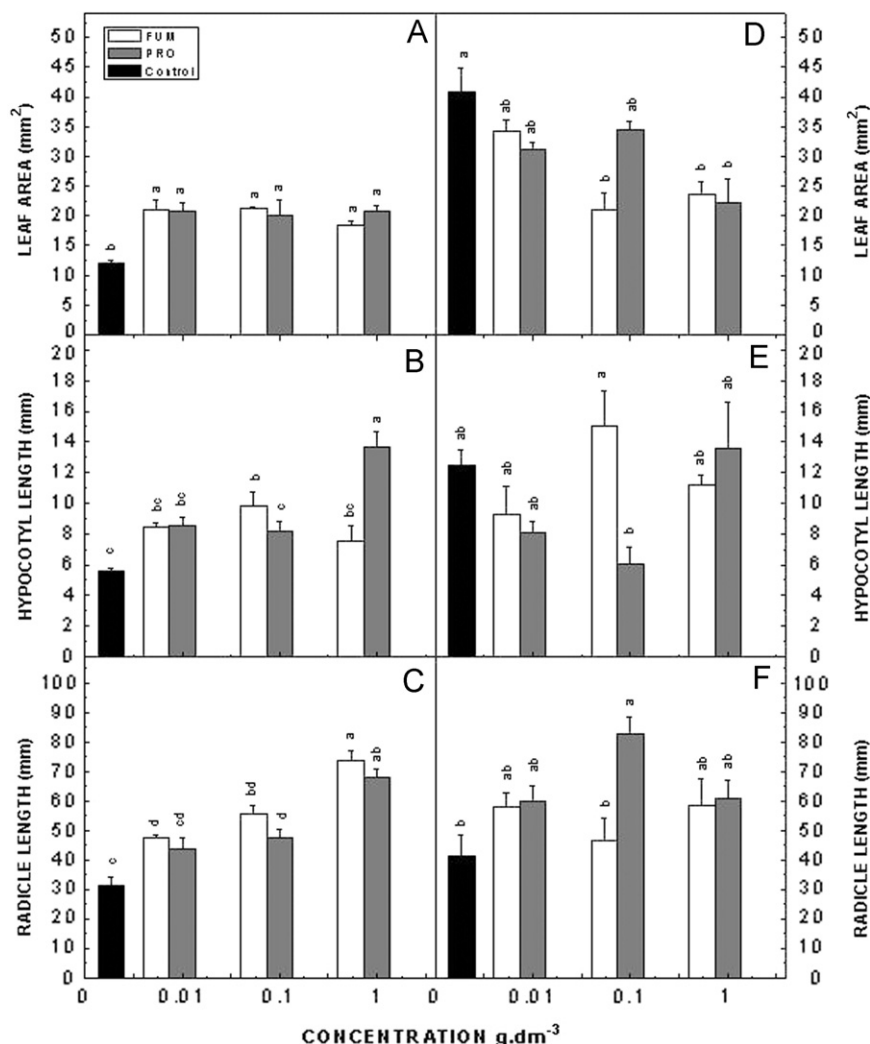


Fig. 7. Mean leaf area values (A, D), hypocotyl length (B, E) and root length (C, F) of *L. sativa* seedlings germinated (A–C), or transferred after germination in water (D–F), to solutions of FUM and PRO from *C. verticillaris* at four concentrations. The seedlings were evaluated 7 day after germination. Means followed by the same letter are do not differ from each another by the Tukey test ($p < 0.05$), means $\pm$ SE, $n=4$.

Allelochemicals can act in several processes simultaneously, producing a differentiated response for each one, depending on the concentration of the compound (Reigosa et al., 1999). The results obtained when the seeds (Fig. 7A–C) and seedlings (Fig. 7D–F) were exposed to FUM and PRO demonstrated that these compounds could be the promoters of the allelopathic effects observed (Figs. 2–6). However, it is likely that these compounds show synergistic action between each other or other compounds present in *C. verticillaris*, given that the crude extracts from this species presented a reduction in the vigor of *L. sativa* seedlings diminishing the germination curve in relation to time (Fig. 1), a result not observed when submitted to isolated compounds FUM and PRO (data not presented). It is possible to speculate about the synergistic action of both FUM and PRO in producing the allelopathic effect of germination reduction (Fig. 2), a result not observed in seedlings submitted to the isolated compounds FUM or PRO (data not shown).

The length of seedlings or their roots are the most commonly used parameters to evaluate the allelopathic effects on development and/or growth (Inderjit and Duke, 2003). Regarding these effects, damage is more common than benefits. The visible effects of the compounds on the seedlings are only secondary signs of previous alterations at molecular and cellular levels. These alterations can be localized, though given that the metabolism

consists of a series of reactions with several feedback controls, entire routes can be altered, resulting in altered processes (Ferreira and Áquila, 2000).

The solubility characteristics of lichen compounds remain unclear, with some evidence of low hydrosolubility (Pereira, 1998). In contrast, results exist showing that certain compounds, including FUM, are hydrosoluble (Ascaso and Galvan, 1976) and that they possess antiherbivore (Reutimann and Scheidegger, 1987) and antineoplastic activity.

Although fumarprotocetraric and protocetraric acids were the substances showing the greatest quantities in *C. verticillaris* (Pereira, 1998), it is possible that they are not responsible for the severe effects observed: chlorosis, root oxidation, high growth inhibition (Figs. 4 and 6). It is also possible that they act in synergy with other compounds, or that these effects are the result of these unidentified substances. However, given that FUM was purified from the acetone extract and that this produced accentuated alterations in the growth of *L. sativa* (Figs. 3 and 5), it can be inferred that this compound is one of the promoters of the effects observed, since it was also determined in significant concentrations in these extracts.

Knowledge concerning allelochemicals will permit the development of new strategies in research concerning natural herbicide models that are more specific and less prejudicial to the

environment than the synthetic herbicides currently applied to crops (Haig et al., 2009). Thus, extracts of *C. verticillaris* could turn out to be bioherbicides used in pest biocontrol programs.

Acknowledgments

R.C. Tigre and E.C. Pereira are grateful to the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarships and fellowships granted.

References

- Ascaso, C., Galvan, J., 1976. Studies on the pedogenetic action of lichen acids. *Pedobiologia* 16, 321–331.
- Barnes, J.P., Putnam, A., 1987. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *J. Chem. Ecol.* 13, 889–905.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press, New York.
- Brasil, 1992. Rules for seeds testing. SNDA/DNDV/CLAV, Ministry of agriculture and agrarian reform, Brasília.
- Campos, J.M.S., Davide, L.C., Soares, G.L.G., Viccini, L.F., 2008. Mitodepressive and clastogenic effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. *Genet. Mol. Biol.* 31, 141–145.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Hernández, B.E., Laguna, G., 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *J. Chem. Ecol.* 24, 2039–2057.
- Culbertson, C.F., 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatography method. *J. Chromatogr.* 72, 113–125.
- Dayan, F.E., Romagni, J.G., Duke, S.O., 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem. Ecol.* 26, 2079–2094.
- Dayan, F.E., Duke, S.O., 2006. Clues in the search for new herbicides. In: Reigosa, M., Pedrol, N., Gonzalez, L. (Eds.), *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Amsterdam, pp. 63–83.
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schrader, K.K., Aliotta, Q., Oliva, A., Romagni, J.G., 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed. Sci.* 50, 138–151.
- Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A., 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. *J. Chem. Ecol.* 5, 815–824.
- Ferreira, A.G., Áquila, M.E.A., 2000. Allelopathy: an emerging field of ecophysiology. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12, 175–204.
- Haig, T.J., Haig, T.J., Seal, A.N., Pratley, J.E., An, M., Wu, H., 2009. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. *J. Chem. Ecol.* 35, 1129–1136.
- Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N., 2004. Using acidinduced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 67, 439–451.
- IBGE, 2009. Brazilian Institute of Geography and Statistics.
- Inderjit, Duke, S.O., 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217, 529–539.
- Labouriau, L.G., 1983. The germination of seeds. OEA, Washington, DC.
- Lawrey, J.D., 1995. Lichen allelopathy: a review. *ACS Symp. Ser.* 582, 26–38.
- Lechowski, Z., Mej, E., Bialczyk, J., 2006. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)–usnic acid. *Environ. Exp. Bot.* 56, 239–244.
- Legaz, M.E., Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant. Physiol.* 71, 300–302.
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. *Crop. Sci.* 2, 176–177.
- Mallik, A.U., 2000. Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview. *J. Chem. Ecol.* 26, 207–209.
- Marante, F.J.T., Castellano, A.G., Rosas, F.E., Aguiar, J.Q., Barreira, J.B., 2003. Identification and quantification of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and antioxidative activity. *J. Chem. Ecol.* 29, 2049–2071.
- Maraschin-Silva, F., Áquila, M.E.A., 2006. Potencial allelopathic potential of native species on germination and early growth of *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta. Bot. Bras.* 20, 61–69.
- Pereira, E.C., 1998. Production of Metabolites by Species of Cladoniaceae from Immobilized Cells. Ph.D. Thesis. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.
- Peterson, J.K., Harrison, H.F., 1991. Differential inhibition of seed germination by sweet potato (*Zpomoea batatas*) root periderm extracts. *Weed. Sci.* 39, 119–123.
- Quayyum, H.A., Mallik, A.U., Leach, D.M., Gottardo, C., 2000. Growth inhibitory effects of nutgrass (*Cyperus rotundus*) on rice (*Oryza sativa*) seedlings. *J. Chem. Ecol.* 26, 2221–2231.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A., González, L., 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 577–608.
- Reutimann, P., Scheidegger, C., 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. *J. Chem. Ecol.* 13, 363–369.
- Romagni, J.G., Rosell, R.C., Nanayakkara, N.P.D., Dayan, F.E., 2004. Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. In: Macias, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G. (Eds.), *Allelopathy*. CRC Press, Boca Raton, pp. 13–33.
- Silva, H.L., Trezzi, M.M., Marchese, J.A., Buzzello, G., Miotto, E., Jr., Patel, F., Debastiani, F., Fiorese, J., 2009. Determinação de espécie indicadora e comparação de genótipos de girassol quanto ao potencial alelopático. *Planta Daninha* 27, 655–663.
- Silva, F.P., 2007. Influence of *Cladonia salzmännii* the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in rhizosphere and seedling development. Master Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Silva, J.B., Nakagawa, J., 1995. Studies of formulas for calculating the speed of germination. *Informativo Abrates* 5, 62–73.
- Souto, X.C., Gonzalez, L., Reigosa, M.J., 1994. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (NW. Spain). *J. Chem. Ecol.* 20, 3005–3015.
- Tukey Junior, H.B., 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Bot. Rev.* 35, 1–16.
- Vasconcelos, T.L., 2009. Influence of phosphorus in the production of substances and processing of soil *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., Master Dissertation, Federal University of Pernambuco, Brazil.
- Young, G.P., Bush, J.K., 2009. Assessment of the Allelopathic Potential of *Juniperus ashei* on Germination and Growth of *Bouteloua curtipendula*. *J. Chem. Ecol.* 35, 74–80.