

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CATEQUINAS DE *Tachigali myrmecophyla* (LEGUMINOSAE)

Lívia T. Lôbo*, Kelly Christina Ferreira Castro, Mara Silvia P. Arruda, Milton N. da Silva, Alberto C. Arruda, Adolfo Henrique Müller, Giselle Maria Skelding P. Arruda e Alberdan Silva Santos

Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário, 66075-970 Belém-PA, Brasil

Antonio Pedro da Silva Souza Filho

Laboratório de Agroindústria, Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, 66095-100 Belém-PA, Brasil

Recebido em 10/11/06; aceito em 20/9/07; publicado na web em 10/3/08

ALLELOPATHIC POTENTIAL OF CATECHINS OF THE *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). Two compounds, (+)-catechin and epicatechin, were isolated from leaves of *T. myrmecophyla*, using chromatographic techniques. The structural identification was carried out on the basis of ¹H and ¹³C NMR spectral data and comparison with literature data. The compounds (+)-catechin and epicatechin were submitted to germination inhibition and radicle and hypocotyl growth assays. Results showed some significant activities confirming the initial hypothesis about allelopathic properties of that plant.

Keywords: *Tachigali myrmecophyla*; allelopathy; catechin.

INTRODUÇÃO

A pecuária é uma atividade que movimenta uma grande parte do mercado nacional e internacional e de grande importância para a economia da Amazônia. Neste contexto, plantas invasoras de pastagem causam elevados prejuízos, pois competem com os pastos saudáveis e, em alguns casos, são letais para o gado.

Para manter o pasto limpo são empregados métodos como a queimada, a roçagem e mais recentemente métodos químicos (herbicidas). Esses métodos tornam-se inadequados, considerando seus custos elevados e a poluição que causam ao meio ambiente.

Estudos mostram que uma planta pode, direta ou indiretamente, interferir no desempenho de outras plantas em sua vizinhança através da produção de substâncias químicas, liberadas para o meio ambiente, fenômeno que Molish, em 1937, chamou de alelopatia.¹

Ao longo das últimas décadas, se observa 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. Inúmeros trabalhos foram publicados nos últimos anos envolvendo a prospecção de substâncias químicas com atividades alelopáticas em espécies arbóreas.²⁻⁸

Tachigali myrmecophyla, pertencente à família Leguminosae e sub-família Ceasalpinoideae, conhecida popularmente como “Tachi preto”, é objeto do presente estudo. Sua escolha para investigação fitoquímica e da atividade alelopática se deu com base em observações de campo. Foi constatado que poucas plantas crescem no entorno do Tachi preto, indicando a presença de substâncias com propriedades alelopáticas. Assim, os testes realizados com seus extratos confirmaram a ocorrência de efeitos alelopáticos sobre plantas invasoras de pastagem.⁹

O levantamento bibliográfico indicou a ausência de informações a respeito da composição química e atividade alelopática da espécie, mostrando a necessidade de realização de estudos.

Substâncias antioxidantes e anti-radicais livres foram encontradas em algumas espécies deste gênero. Foram isolados vários

flavonóides, bem como as substâncias ácido indolacético, aldeído cafeico, 4-hidroxi-benzoato de metila, 3,4-diidroxi-benzoato de metila, triptamina, metil-triptamina e sitosterol.¹⁰⁻¹²

T. myrmecophyla é encontrada em grande quantidade na Amazônia, estando entre as 15 espécies mais comuns na Floresta Nacional do Tapajós.¹³ É uma árvore muito resistente à ausência de luz, suportando estados de sufocamento durante vários anos e lentos reflorestamentos. Cavidades em seu tronco tornam-se habitat de algumas espécies de formigas.¹⁴

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e materiais

A concentração dos extratos foi realizada em evaporador rotativo Büchi modelo EL 131. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Mercury-Varian a 300 MHz (¹H) e 75 MHz (¹³C) (DQ/UFGPA), utilizando técnicas uni e bidimensionais. Os solventes empregados foram CD₃OD e (CD₃)₂CO. Para a cromatografia em coluna utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 Mesh), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser analisada. A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi empregada para a análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna, sendo utilizadas placas de vidro com fase fixa preparadas em uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ 7749 (Merck) em água. Para análise e isolamento das substâncias utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento Shimadzu, com duas bombas LC-8 AD, sistema de injeção manual (looping de 100 µL), detector SPD 10 AV UV-Visível (em um comprimento de onda de 245 nm) e uma interface CBM, software Class 3.1. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna semi-preparativa Luna C18 (25 x 1 cm) e pré-coluna de C18. Como fase móvel, utilizou-se mistura de solventes água ultra-pura, obtida de um sistema milipore (Elgamax), com 1,25% de ácido fórmico e acetonitrila, em um fluxo de 3,0 mL/min. Os solventes foram filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm e mantidos em um banho de ultra-som durante 30 min.

*e-mail: livia_lobo@yahoo.com.br

Coleta e identificação do material botânico para análise fitoquímica

As folhas de *Tachigali myrmecophyla* foram coletadas no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém, estado do Pará, pelo agrônomo Dr. A. P. Souza Filho, pesquisador da instituição, estando uma excisada depositada no Herbário da instituição, sob registro de número IAN 179599.

Obtenção dos extratos brutos

A partir do material botânico (folhas) seco e moído (3,7 kg) foi preparado o extrato hidroalcoólico, por percolação, com mistura de metanol/água, na proporção de 8:2, sob aquecimento em *banho-maria*, por um período de 8 h, seguido de filtração e evaporação do metanol em evaporador rotativo a 45 °C, obtendo-se um extrato aquoso. Este foi submetido à extração líquido/líquido, utilizando-se os solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila, sucessivamente. Em seguida os solventes foram evaporados em evaporador rotativo, obtendo-se as fases hexano (3 g), diclorometano (12 g) e acetato de etila (31 g).

Seleção do material a ser estudado

Inicialmente o extrato hidroalcoólico foi submetido a bioensaios de inibição da germinação de sementes de planta invasora de pastagem *Mimosa pudica*, apresentando um percentual de inibição de 50%. O fracionamento do extrato foi então biomonitorado. As fases dele derivadas (diclorometânica e acetato de etila) apresentaram inibições consideráveis (78 e 84%, respectivamente), sendo assim selecionadas para refraçãoamento.

Fase diclorometânica

A fase diclorometânica foi estudada primeiramente, resultando no isolamento de um derivado C₁₃ carotenóide, a 4,5-diidroblumenol A. A determinação estrutural e os ensaios realizados com esta substância foram relatados na literatura.⁹

Fase acetato de etila

A fase acetato de etila (FA, 31,0 g) foi fracionada por CCVU filtrante, usando-se como fase estacionária sílica desativada com MeOH/H₂O na proporção de 1:1, utilizando-se os solventes nas seguintes proporções: diclorometano 100% (A₁, 0,0264 g), diclorometano/acetato de etila 50% (A₂, 0,0954 g), acetato de etila 100% (A₃, 0,457 g), acetato de etila/MeOH 50% (A₄, 21,8g) e MeOH 100% (A₅, 8,6 g). Os sistemas de eluição usados foram selecionados com base em CCDC.

As frações A₄ (21,8 g) e A₅ (8,6 g) foram selecionadas para refraçãoamento pelas expressivas massas apresentadas, o que normalmente possibilita o isolamento e a identificação estrutural das substâncias em quantidades suficientes para a realização dos ensaios alelopáticos. Essas frações foram analisadas por CLAE, exibindo para A₄ um cromatograma com melhor resolução quando comparado com o de A₅, o qual se mostrou bastante complexo e de difícil separação. Também foram realizadas análises de seus espectros de RMN, nos quais foram identificados sinais característicos de flavonóides para A₄ e de substâncias poliméricas do tipo taninos condensados para A₅. Com base nessas evidências optou-se por refraionar apenas A₄.

A₄ foi refraionada por CCVU filtrante, utilizando-se sílica gel desativada com MeOH/H₂O na proporção de 1:1, usando-se mistu-

ras de solvente com polaridade crescente: acetato de etila 100% (A₄₍₁₎, 2,6 g), acetato de etila/MeOH 10% (A₄₍₂₎, 1,9 g), acetato de etila/MeOH 50% (A₄₍₃₎) e MeOH 100% (A₄₍₄₎).

A fração acetato de etila 100% (A₄₍₁₎, 2,6 g) foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo solubilizada em uma solução aquosa ácida a 1,25% de ácido fórmico, filtrada em membrana filtrante com diâmetro de poros de 0,25 µm, sendo posteriormente injetada uma alíquota de 20 µL. Foi utilizado um sistema isocrático de H₂O (1,24% de ácido fórmico)/CH₃CN 10% em 25 min, em seguida um gradiente de 10 a 25% de CH₃CN em 10 min e por fim a permanência do sistema isocrático em 25% de CH₃CN, para limpeza da coluna.

Utilizando-se a mesma metodologia analítica aplicada anteriormente, foi realizada a separação dos picos principais da fração A₄₍₁₎ por CLAE preparativo, resultando em 17 frações, as quais foram analisadas por RMN ¹H e ¹³C. Destas frações, só foi possível a identificação estrutural das substâncias presentes nas frações 6 e 8, visto que as demais apresentaram massas muito pequenas, resultando em espectros de RMN com relação sinal/ruído muito baixa, impossibilitando suas interpretações. Da fração 6 (10,0 mg) foi caracterizada a catequina (S₁) e da fração 8 (15,0 mg) a epicatequina (S₂), com base na análise de seus dados espectrais de RMN e comparação com dados da literatura.^{15,16}

(+)-catequina (S₁). RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ: 6,83 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-2'); 6,76 (*d*, *J* = 8,1 Hz, H-5'); 6,71 (*dd*, *J* = 8,1 e 1,8 Hz, H-6'); 5,93 (*d*, *J* = 2,2 Hz, H-6); 5,85 (*d*, *J* = 2,2 Hz, H-8); 4,57 (*d*, *J* = 7,5 Hz, H-2); 3,97 (*m*, H-3); 2,85 (*dd*, *J* = 16,1 e 5,5 Hz, H-4α); 2,51 (*dd*, *J* = 16,1 e 8,2 Hz, H-4β). RMN ¹³C [75 MHz, (CD₃)₂CO+ gts D₂O] δ: 157,5 (C-7); 157,0 (C-9); 156,6 (C-5); 145,6 (C-3'); 145,5 (C-4'); 131,7 (C-1'); 119,8 (C-6'); 115,6 (C-5'); 115,2 (C-2'); 100,3 (C-10); 96,0 (C-6); 95,1 (C-8); 82,4 (C-2); 68,0 (C-3); 28,6 (C-4).

epicatequina (2). RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ: 6,97 (*d*, *J* = 1,2 Hz, H-2'); 6,79 (*dd*, *J* = 8,1 e 1,2 Hz, H-6'); 6,75 (*d*, *J* = 8,1 Hz, H-5'); 5,93 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-6); 5,91 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-8); 4,82 (*sl*, H-2); 4,17 (*sl*, H-3); 2,85 (*dd*, *J* = 16,8 e 4,5 Hz, H-4α); 2,72 (*dd*, *J* = 16,8 e 2,4 Hz, H-4β). RMN de ¹³C [75 MHz, (CD₃)₂CO+ gts D₂O] δ: 157,3 (C-5); 157,1 (C-9); 156,7 (C-7); 145,1 (C-4'); 145,0 (C-3'); 131,7 (C-1'); 119,0 (C-6'); 115,4 (C-5'); 115,0 (C-2'); 99,5 (C-10); 96,0 (C-6); 95,3 (C-8); 79,1 (C-2); 66,6 (C-3); 28,5 (C-4).

Análise da atividade alelopática

As avaliações dos efeitos potencialmente alelopáticos das substâncias isoladas e identificadas foram realizadas frente à germinação de sementes bem como ao desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*).

As sementes dessas duas plantas daninhas foram coletadas em áreas de pastagens cultivadas no município de Castanhal, estado do Pará. Posteriormente, passaram por processo de limpeza e foram tratadas com ácido sulfúrico, objetivando a superação da dormência, conforme estabelecido por Souza Filho.¹⁷

Os bioensaios de germinação de sementes foram monitorados no período de 5 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm.^{18,19} O bioensaio foi desenvolvido em condições de 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 h. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu 10 sementes, nas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/L, tendo como solvente a acetona. O tratamento 0,0 foi considerado testemunha e constou apenas de água destilada. Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL de solução,

quando do início de cada bioensaio, sendo adicionada apenas água destilada, sempre que preciso. Após evaporação do solvente, adicionava-se água destilada na mesma quantidade do solvente evaporado, mantendo-se, assim, a concentração original.

Os efeitos alelopáticos de S_1 e S_2 sobre o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foram avaliados nas mesmas condições do bioensaio de germinação, medindo-se, ao final de 5 dias de crescimento, o comprimento da radícula e do hipocótilo. Nestes bioensaios foram utilizadas duas sementes pré-germinadas por placa de Petri. As substâncias foram adicionadas apenas uma vez, quando do início do bioensaio, sendo adicionado a partir de então apenas água destilada quando necessário. Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL da solução com as substâncias, nas respectivas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/L. Após evaporação do solvente, adicionou-se volume igual de água destilada, mantendo-se, dessa forma, a concentração original. Como tratamento testemunha utilizou-se a água destilada.

Todos os bioensaios, tanto o de germinação quanto os de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, foram feitos e avaliados em triplicata (Figuras 2 a 7), conforme metodologia disponível na literatura.^{8,9}

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as medidas comparadas pelo teste de Tukey (5%). Na análise desses dados utilizou-se o *software* SAS.²⁰

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias S_1 e S_2 foram isoladas por CLAE, de uma fração da fase acetato de etila, como descrito anteriormente.

Os dados espectrais das substâncias S_1 e S_2 , por se tratarem de epímeros, são muito semelhantes. Na análise do espectro de RMN ^1H de S_1 observaram-se quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos: dois duplos dupletos integrando um hidrogênio cada, centrados em δ 2,50 e 2,85, característicos de hidrogênios de grupo metilênico ligado a carbono oximetínico; um multipletto em δ 3,97, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico e um duplete, integrando um hidrogênio, em δ 4,57, característico de hidrogênio oximetínico-benzílico. Esse conjunto de sinais é típico do anel C de catequinas.

Na região de hidrogênios aromáticos, observaram-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em δ 6,83 (*d*, $J = 1,8$ Hz, 1H), 6,71 (*dd*, $J = 8,1$ e 1,8 Hz, 1H) e 6,76 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H), bem como dois dupletos *meta* relacionados ($J = 2,2$ Hz, 1H cada) em δ 5,93 e 5,85, atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 do anel A da catequina. Estes acoplamentos foram todos confirmados através da análise do espectro COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$.

A análise do espectro de RMN ^{13}C de S_1 , em conjunto com o espectro HSQC, bem como a comparação com os dados da literatura,¹⁵ permitiu atribuir os 15 sinais observados aos quinze carbonos da estrutura da (+)-catequina, em destaque para o sinal em δ 82,4, que é atribuído ao carbono oximetínico-benzílico C-2, sendo este um dos sinais mais importantes para distinguir a (+)-catequina do seu epímero em C-3, a epicatequina, que exibe para C-2 um sinal em δ 79,1.

A análise do espectro HSQC de S_1 também foi importante para atribuir, com precisão, os sinais em δ 115,6 e 115,2 aos carbonos C-5' e C-2', respectivamente, visto que mostraram correlações ^1J com os sinais em δ 6,76 e 6,83, os quais haviam sido atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5' e H-2'.

Os dados de RMN ^1H de S_2 são similares aos de S_1 , destacando-se apenas pequenas diferenças tanto no deslocamento químico como no padrão de acoplamento, principalmente com relação aos hidrogênios alifáticos. Por exemplo, H-2 e H-3 exibem singletos largos em δ 4,82 e 4,17, respectivamente, e H-4 β um duplo duplete em δ 2,72 com J 16,8 e 2,4 Hz, tudo isso em consequência da mudança da estereoquímica do carbono C-3 (OH- α) em S_2 .

Os dados espectrais de RMN ^{13}C de S_2 também são semelhantes aos de S_1 , destacando-se como diferença apenas os sinais atribuídos aos carbonos C-2 (δ 79,1) e C-3 (δ 66,6), caracterizando a estereoquímica diferenciada de S_2 em relação a S_1 , ou seja, S_2 tem estereoquímica relativa 3-OH α , tratando-se portanto de um epímero de S_1 . Esses dados foram comparados com a literatura,¹⁶ o que permitiu confirmar que S_4 se trata da epicatequina.

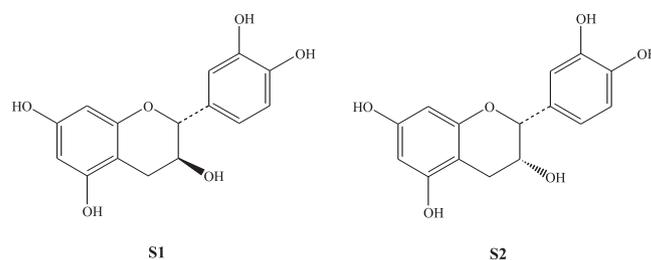


Figura 1. Estruturas das substâncias isoladas de *Tachigali myrmecophyla*: catequina (S_1) e epicatequina (S_2)

Atividade alelopática

No bioensaio de germinação de sementes com a substância S_1 , utilizando-se o mata-pasto como espécie receptora, não foi observado um aumento de inibição de germinação diretamente proporcional à concentração de S_1 , sendo de 27% a inibição mais intensa, na concentração de 20 mg/L. Entretanto, para a espécie receptora malícia, a inibição da germinação, apesar de apresentar níveis baixos, exibiu um aumento associado à concentração, sendo de 33% a inibição de maior magnitude na concentração de 20 mg/L.

Para a substância S_2 , independentemente da espécie receptora (malícia ou mata-pasto), a inibição da germinação esteve pouco associada à concentração, sendo as inibições mais intensas observadas a 20 mg/L de S_2 . Entretanto, o nível de inibição de germinação para a espécie receptora malícia, apresentou um crescimento associado à concentração a partir da concentração de 10 mg/L, sendo de 75% a inibição de maior magnitude, obtida para a germinação das sementes de malícia na concentração de 20 mg/L de S_2 .

Os efeitos observados das inibições sobre o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo para a substância S_1 não estiveram associados à concentração da substância. As inibições observadas sobre esses dois parâmetros foram de magnitudes expressivamente superiores às observadas sobre a germinação. Das espécies receptoras, a malícia apresentou os desenvolvimentos da radícula e do hipocótilo inibidos em níveis superiores aos do mata-pasto, com exceção da concentração a 20 mg/L tanto para radícula quanto para o hipocótilo, ainda assim, com níveis de inibição superiores a 66%. Das duas espécies de invasoras, o mata-pasto foi aquela que evidenciou maior sensibilidade aos efeitos de S_1 , com reduções da ordem de 81% na concentração de 20 mg/L, para inibição do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo.

Esses resultados indicam que S_1 tem maiores possibilidades para inibir o desenvolvimento das plantas que a germinação das sementes das espécies de plantas invasoras de pastagens analisadas.

Para a substância S_2 , os efeitos observados das inibições sobre o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo estiveram associa-

dos à concentração da substância. As inibições observadas sobre esses dois parâmetros foram de magnitude inferior às observadas sobre a germinação. Das espécies receptoras, o mata-pasto teve o desenvolvimento da radícula inibido em níveis superiores aos da malícia. O mata-pasto sofreu inibições superiores a 20%, com destaque para a inibição de 47% na concentração de 20 mg/L. Para inibição do desenvolvimento do hipocótilo, a espécie receptora ma-

lícia apresentou inibição superior à do mata-pasto, com destaque para a inibição em torno de 45% na concentração de 20 mg/L.

Esses resultados indicam que S_2 tem maiores possibilidades para inibir a germinação das plantas que o desenvolvimento das espécies invasoras de pastagens analisadas, visto que não apresentou níveis de inibição regular para o desenvolvimento da radícula e hipocótilo.

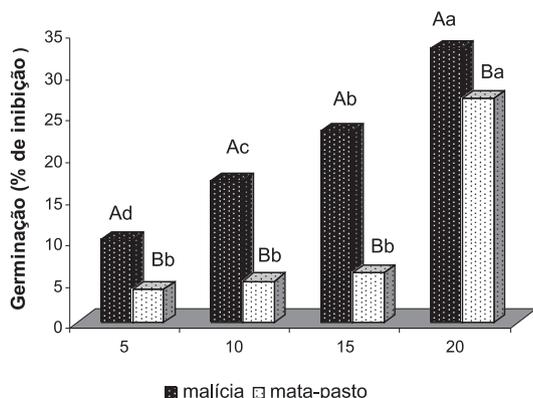


Figura 2. Efeitos alelopáticos da catequina sobre a germinação das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

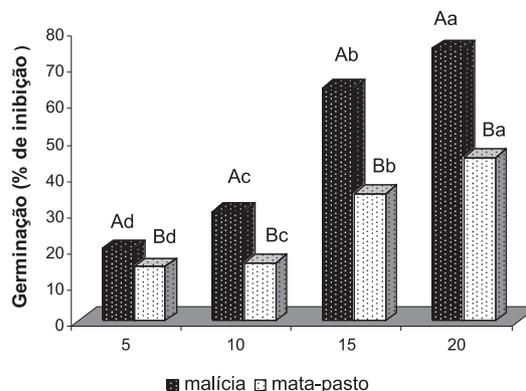


Figura 5. Efeitos alelopáticos da epicatequina sobre a germinação das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

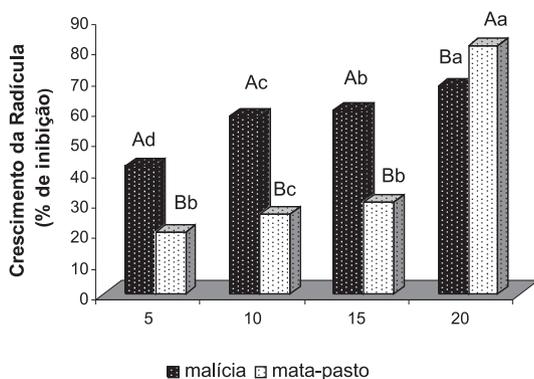


Figura 3. Efeitos alelopáticos da catequina sobre o crescimento da radícula das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

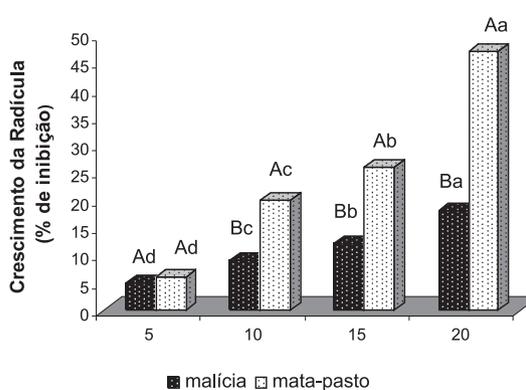


Figura 6. Efeitos alelopáticos da epicatequina sobre o crescimento da radícula das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

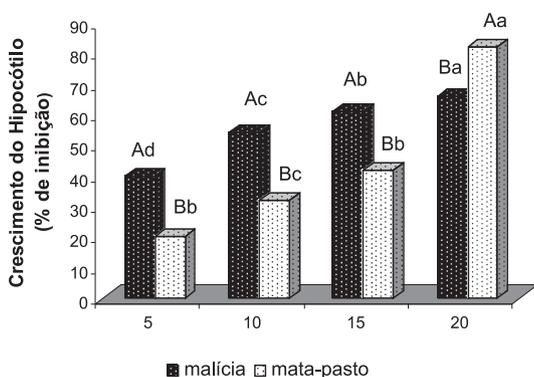


Figura 4. Efeitos alelopáticos da catequina sobre o crescimento do hipocótilo das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

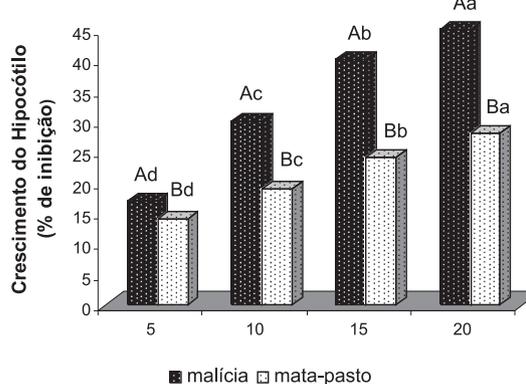


Figura 7. Efeitos alelopáticos da epicatequina sobre o crescimento do hipocótilo das plantas daninhas malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

AGRADECIMENTOS

À Capes pela bolsa e pelo suporte financeiro. À EMBRAPA Amazônia Oriental na pessoa do Dr. A. P. de Souza Filho pela realização dos ensaios alelopáticos.

REFERÊNCIAS

1. Waller, G. R.; *Allelochemical, role in agriculture and forestry*, American Chemical Society: Washington, D.C, 1987.
2. Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. de M.; *Planta Daninha* **2000**, *18*, 435.
3. González, A. G.; Guillermo, J. A.; Ravelo, A. G.; Jimenez, I. A.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 400.
4. Borges, E. E. L.; Lopes, E. S.; Silva, G. F. R.; *Árvore* **1993**, *17*, 69.
5. Rizvi, D. J. H.; *Crit. Ver. Plant Sci.* **1999**, *18*, 773.
6. Lisanework, N.; Michelsn, A.; *Agrofor. Syst.* **1993**, *21*, 63.
7. Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. de M.; *Alelopatia em ecossistema de pastagens cultivadas*, EMBRAPA – CPATU: Belém, 1998.
8. Arruda, M. S. P.; Araújo, M. Q. de; Lobo, L. T.; Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M.; Santos, L. D.; Muller, A. H.; Arruda, A. C.; Guilhon, G. M. S. P.; *Allelopat. J.* **2005**, *15*, 211.
9. Souza Filho, A. P. S.; Lôbo, L. T.; Arruda, M. S. P.; *Planta Daninha* **2005**, *23*, 557.
10. Cioffi, G.; D'auria, M.; Branca, A.; Mendez, J.; Castillo, A.; Morelli, I.; Desimone, F.; Detommasi, N.; *J. Nat. Prod.* **2002**, 1526.
11. Svoboda, K. S.; Smolenski, S. J.; Kinghorn, A. D.; *J. Nat. Prod.* **1979**, 309.
12. Dias, S. M. C.; Maia, J. G. S.; Ferreira, Z. S.; Gottlieb, O. R.; *Acta Amazônica* **1987**, 805.
13. Guimarães, E. G. T.; Pyle, E. H.; *L. B. A. Ecologia* **1999**, 30.
14. Fonseca, C. R.; *J. Ecology* **1994**, 833.
15. Kuo, Y. H.; Li, Y. C.; *J. Chin. Chem. Soc.* **1997**, *44*, 321.
16. Foo, L. Y.; Lua, Y.; Howellb, A. B.; Vorsab, N.; *Phytochemistry* **2000**, *54*, 173.
17. Souza Filho, A. P. S.; Dutra, S.; Silva, M. A. M. M.; *Planta Daninha* **1998**, *16*, 3.
18. Duram, R. D.; Tortosa, M. E.; *Weed Sci. Technol.* **1985**, *13*, 155.
19. Juntilla, O.; *Physiol. Plant.* **1976**, *29*, 264.
20. Sas-Institute; *Statistical Analysis Systems. User's guide*, Cary, 1989.