



Avaliação de extratos das folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) como bioerbicidas pós-emergentes e identificação de aleloquímicos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

ISEQUIEL DOS SANTOS MENDES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Química Analítica.

Orientadora: MARIA OLÍMPIA DE OLIVEIRA REZENDE

Janeiro, 2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Mendes, Isequiel dos Santos

Avaliação de extratos das folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) aplicados como bioerbicidas pós-emergentes e identificação de aleloquímicos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). / Isequiel dos Santos Mendes. -- São Carlos, IQSC, 2011

74 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2011.

Edição revisada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Olímpia de Oliveira Rezende

1. *Canavalia ensiformis*. 2. Bioerbicidas. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

*A meus pais, a quem devo tudo o que tenho
e o que sou.*

*A meus irmãos e irmãs,
que estão sempre por perto.*

AGRADECIMENTOS

Quero aqui agradecer a tudo e a todos que contribuíram ou proporcionaram um ambiente agradável e propício para tudo o que produzi até este momento.

✓ A todos que passaram ou estão ainda no Laboratório de Química Ambiental: Jussara, Raquel, Joel, Clever, Silvia, Paulo Roberto, Fernanda, Túlio, Flávia, Claudinha, Rachid, Leandro (primo), obrigado pelo apoio, colaboração e valiosas dicas que contribuíram muito para realização deste trabalho.

✓ À galera do 'sindicato', Bruno Palmito (presidente), Robertinha (secretária), Régis 50tão, Livia Pedrita, Danielly Michelly, pessoal que esteve comigo todo o tempo, pela amizade e os ótimos momentos que passamos nos divertindo abrindo aquelas ampolas geladas. 😊

✓ Aos professores com quem tive contato direto durante o curso, em especial à profa. Salete e ao prof. Gilberto Chierice, cuja colaboração e ajuda foram determinantes para continuidade deste trabalho.

✓ Ao pessoal do CAQI, BIBLIOTECA, SEÇÃO de PÓS-GRADUAÇÃO e das OFICINAS pela colaboração, disposição e eficiência nos trabalhos realizados e também à CAPES pelo financiamento concedido para realização do trabalho.

✓ Um agradecimento especial à Sra Maria Diva Landgraf, uma pessoa que possui brilho próprio, e consegue iluminar a quem esteja junto a ela, meu muito obrigado a você Lorinha.

✓ Um último agradecimento, porém o mais importante, à Profa. Dra. *MARIA OLIMPIA DE OLIVEIRA REZENDE*. Agradeço pela oportunidade dada, pela dedicação e seriedade durante todo tempo, onde se manteve sempre muito prestativa no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

✓ A TODOS, MUITO OBRIGADO !!!



RESUMO

A utilização de compostos químicos no controle de pragas que afetam negativamente a produção agrícola tem sido objeto de muitas críticas por parte de ambientalistas e pesquisadores devido aos problemas ambientais proporcionados por tais substâncias. Nos últimos anos tem-se dedicado bastante tempo e recursos em pesquisas que levem à descoberta de produtos para controle de pragas que tragam nenhum ou o menor prejuízo possível ao ambiente. Neste sentido, o estudo da alelopatia busca a utilização de compostos oriundos da própria natureza para uso no combate a espécies invasoras em plantações, na esperança de ter-se um controle prático e efetivo sobre plantas daninhas minimizando-se a contaminação ambiental. Neste trabalho foram utilizados extratos aquosos de sementes e folhas da leguminosa feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) como um bioerbicida pós-emergente aplicado no controle das plantas daninhas trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*), e foi avaliada também a seletividade dos extratos com relação a cultivares de soja (*Glycine max*) convencional e transgênica. Foram preparados tratamentos em seis diferentes concentrações e aplicados em três diferentes períodos, sendo avaliados seus efeitos de toxicidade e seletividade sobre o desenvolvimento das plantas daninhas e da soja. Os resultados foram submetidos à análise de variância e aplicou-se o teste F a 1% de probabilidade, mostrando que os tratamentos mais eficazes no controle das invasoras foram aqueles preparados a partir das sementes de feijão-de-porco nas concentrações 25 e 50 g L⁻¹, que interromperam completamente o desenvolvimento das plantas daninhas, sem causar, no entanto qualquer efeito aparente sobre a soja, tanto transgênica quanto convencional. Foram realizadas também determinações cromatográficas para identificação de compostos fenólicos em amostras de folhas de feijão-de-porco. Mediante a comparação com compostos padrão e variação de comprimento de onda na região do ultravioleta-visível foi possível identificar os compostos ácido clorogênico, ácido p-anísico, naringina e rutina, cujas concentrações encontradas, relativas às amostras, foram de 4,42 mg L⁻¹, 6,0 mg L⁻¹, 3,75 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ respectivamente.

Palavras chave: *Canavalia ensiformis*, trapoeraba, corda-de-viola, ácidos fenólicos, bioerbicidas, pós-emergência.

ABSTRACT

The use of chemicals to control pests that adversely affect agricultural production has been treated with great concern due environmental issues provided by such substances. In the last years much time and money were devoted in researchs leading to discovery products to control pests that bring no or the least damage to the environmet. In this sense, the use of allelopathic species for controlling invasive species is an environmental friendly technique. In this work aqueous extracts of seeds and leaves of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) were used as a post-emergent bioherbicide succesfully applied for control of dayflower (*Commelina benghalensis*) and morningglory (*Ipomoea grandifolia*), and selectivity on conventional and transgenic soybean (*Glycine max*) cultivars. Treatments were prepared in six different concentrations and applied in three different periods, being analyzed the effects of toxicity and selectivity on the development of weeds and soybean. The results were subjected to analysis of variance and applied the F test at 1% probability, showing that the most effective treatments in controlling the weeds were those prepared from seeds of Jack bean at concentrations of 25 and 50 g L⁻¹, that totally controlled weeds, however causing no apparent injury on soybeans, both transgenic and conventional. Chromatographic analysis were also performed for identification of phenolic compounds in samples of Jack bean leaves. By comparison with standards and changes in wavelength on ultraviolet-visible spectra was possible to identify clorogenic acid, p-anisic acid, naringin and rutin compounds at concentrations of 4.42 mg L⁻¹, 6.0 mg L⁻¹, 3.75 mg L⁻¹ and 5.0 mg L⁻¹ respectively.

Keywords: *Canavalia ensiformis*, benghal dayflower, morningglory, phenolic acids, bioherbicides, post-emergent.

Índice de tabelas

Tabela I: Informação sobre o aparecimento da agricultura ¹ -----	13
Tabela III: Mapa dos herbicidas resumido ³¹ -----	22
Tabela IV: Padrões, solventes e outros materiais utilizados neste trabalho -----	33
Tabela V: Caracterização física do solo utilizado -----	34
Tabela VI: Caracterização química do solo utilizado -----	34
Tabela VII: Massas de extratos aquosos obtidas a partir de 300g de material vegetal previamente seco e moído-----	36
Tabela VIII: Condições cromatográficas empregadas nas análises das amostras de folhas -----	40
Tabela IX: Descrição dos conceitos aplicados as avaliações de toxicidade – SBCPD ⁵⁶ -----	43
Tabela X: Escala de conceitos da ALAM* utilizada para avaliação da porcentagem de eficácia de controle de plantas daninhas -----	43
Tabela XI: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em dose única-----	44
Tabela XII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em duas etapas, sendo a 2 ^a aplicada 3 dias após a 1 ^a -----	45
Tabela XIII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em 5 doses-----	45
Tabela XIV: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em dose única -----	45
Tabela XV: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em duas etapas, sendo a 2 ^a aplicada 3 dias após a 1 ^a -----	46
Tabela XVI: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em 5 doses -----	46
Tabela XVII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , dos efeitos dos tratamentos sobre corda-de-viola -----	47
Tabela XVIII: Avaliação segundo ALAM, da porcentagem de controle dos tratamentos sobre corda-de-viola-----	48
Tabela XIX: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , dos efeitos dos tratamentos sobre trapoeraba-----	50
Tabela XX: Avaliação segundo ALAM, da porcentagem de controle dos tratamentos sobre trapoeraba -----	51

Tabela XXI: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD ⁵⁶ , para o tratamento ES-50 sobre plantas daninhas e cultivares de soja -----	53
Tabela XXII: Biomassa seca obtida para corda-de-viola -----	55
Tabela XXIII: Biomassa seca obtida para trapoeraba -----	56
Tabela XXIV: Compostos identificados com seus respectivos tempos de retenção e comprimento de onda que absorvem na região do UV-Vis -----	64
Tabela XXV: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os compostos determinados -----	64

Índice de figuras

Figura I: Espectros na região do UV-Vis para os compostos padrão utilizados no trabalho	40
Figura II: Gráfico ilustrando a relação entre as biomassas secas de corda-de-viola	55
Figura III: Gráfico ilustrando a relação entre as biomassas secas de trapoeraba.....	56
Figura IV: Cromatograma comparativo para identificação e seletividade entre os compostos rutina e ácido ferúlico em $\lambda = 325$ nm.....	58
Figura V: Cromatograma comparativo para identificação e seletividade entre os compostos rutina e ácido ferúlico em $\lambda = 265$ nm.....	59
Figura VI: Cromatograma comparativo para identificação do ácido p-anísico através de padrão em $\lambda = 325$ nm.....	59
Figura VII: Cromatograma comparativo para identificação do ácido p-anísico através de padrão em $\lambda = 265$ nm.....	60
Figura VIII: Cromatograma comparativo para identificação dos compostos ácido clorogênico e naringina na amostra através de padrão em $\lambda = 340$ nm	61
Figura IX: Cromatograma comparativo para identificação dos compostos ácido clorogênico e naringina na amostra através de padrão em $\lambda = 290$ nm	61
Figura X: Gráfico representando a curva analítica do composto rutina	62
Figura XI: Gráfico representando a curva analítica do composto ácido p-Anísico	62
Figura XII: Gráfico representando a curva analítica do composto ácido clorogênico.....	63
Figura XIII: Gráfico representando a curva analítica do composto naringina.....	63

Sumário

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
Índice de tabelas	8
Índice de figuras	10
1. Introdução	13
1.1. Histórico.....	13
1.2. Herbicidas.....	19
1.3. Alelopatia	25
1.4. Feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>)	28
1.5. Cromatografia	29
2. Objetivos	32
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais	33
3.1.1. Substâncias padrão de referencia, solventes e outros materiais	33
3.1.2. Equipamentos	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Local, cultura e condições gerais do experimento	34
3.2.2. Obtenção dos extratos aquosos de folhas e sementes de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>).....	35
3.2.2.1. Terminologia utilizada	37
3.2.3. Procedimento de Aplicação dos extratos	37
3.2.4. Extração das amostras e condições para análise cromatográfica ..	39
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Experimentos utilizando extratos de folhas e sementes de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>)	42
4.1.1. Avaliação dos efeitos observados.....	42
4.1.2. Avaliação do volume ótimo para aplicação	43
4.2. Avaliação dos dados obtidos após aplicação dos extratos	47
4.2.1. Avaliação dos tratamentos aplicados sobre corda-de-viola	47

4.2.3. Avaliação da seletividade do tratamento ES-50 aplicado sobre parcelas constituídas pelas plantas daninhas e soja	52
4.3. Análise de Massa Seca	54
4.4. Análise cromatográfica via HPLC	57
5. Conclusões.....	67
6. Referências Bibliográficas.....	69

1. Introdução

1.1. Histórico

Desde seus primeiros passos na trajetória evolutiva, quando o homem primitivo desceu das árvores há alguns milhares de anos, a humanidade luta para sempre viver mais, e melhor. Ainda na Pré-história ocorreram algumas descobertas que auxiliaram o homem neste sentido, dando-lhe suporte tecnológico para se tornar a espécie dominante sobre a Terra. A roda e o fogo são indiscutivelmente as mais importantes e conhecidas, e pode-se agrupar a essas também, a descoberta, ou mais especificamente a observação que o homem fez na natureza, que o levou a criar um modo de obtenção de seu alimento que hoje se conhece como agricultura.

Tabela I: Informação sobre o aparecimento da agricultura¹

Onde foi inventada a agricultura		
Região	Cultivares	1ª Referência
<i>Crescente Fértil</i>	Trigo, cevada e ervilha	10.500 a.C.
<i>China</i>	Arroz e milhete	9.500 a.C.
<i>Mesoamérica</i>	Milho, feijão e abóbora	5.500 a.C.
<i>Andes/Amazônia</i>	Batata e mandioca	5.500 a.C.
<i>Leste dos EUA</i>	Sorgo e arroz selvagem	4.500 a.C.

A Tabela I traz alguns dados sobre datas e locais do surgimento de algumas plantações, exemplos de cultivares que atravessaram milênios sem perder sua importância e que, conseqüentemente, ainda fazem parte da base alimentar humana.

Nos primórdios, o homem notou que alguns dos grãos coletados para a sua alimentação poderiam ser enterrados com o intuito de produzir novas

plantas iguais às que os originaram. Surgia nesse instante o embrião da agricultura, a prática de plantio de sementes que trouxe o aumento da oferta de alimentos, e as plantações passaram a ser cultivadas muito mais próximas dos povoados diminuindo os perigos da busca por alimento, o que representou enorme vantagem para o homem da época².

A experiência ao longo do tempo permitiu também aos primeiros agricultores a seleção entre os grãos com características de maior interesse (tamanho, produtividade, sabor). Trigo e cevada cresciam entre as árvores no Oriente Médio (13 mil anos atrás), muito mais abundantes e nutritivos que outras espécies, e foram os principais entre as primeiras plantas domesticadas¹.

É impossível estimar a importância do trigo para a humanidade, pois foi esse alimento que deu a estabilidade necessária para que o homem criasse as bases da civilização ocidental, Babilônia, Egito, Roma, Grécia e mais tarde as civilizações do norte e oeste europeu e, qualquer outra civilização que tenha sido formada, teve sua base fundada graças a algum tipo de agricultura de cereais³.

Com o progresso, houve um natural aumento nas populações, e com ela também a necessidade de se aumentar a produção alimentar. Esse aumento esbarrou em alguns obstáculos principais, como as restrições devidas a espaço físico reduzido para plantio (principalmente na Europa) e doenças e pragas que atacavam as plantações.

O termo Praga pode ser definido de muitas formas, uma delas está no D.O.U.¹⁶ como “qualquer espécie, raça ou biótipo vegetal ou animal ou agente patogênico danoso para as plantas ou produtos vegetais”. A Convenção

Internacional de Proteção Vegetal (CIPV) realizada em novembro de 1997 pela FAO (Divisão da ONU para Agricultura e Alimentação), sintetizou a definição como “qualquer espécie, raça ou biótipo vegetal ou animal ou agente patógeno daninho para as plantas ou produtos vegetais”¹⁷.

Assim como o conceito de praga, o conceito de planta daninha é bastante amplo e relativo. Para Lorenzi¹⁸, por exemplo, planta daninha é qualquer vegetal que cresce onde não é desejado, e ainda nessa linha, para Kissmann¹⁹ nenhuma planta é intrinsecamente nociva, de acordo com as circunstâncias ela pode ser desejada, indiferente ou indesejada.

Para controlar ou eliminar uma praga pode-se utilizar compostos químicos conhecidos como pesticidas. Agroquímico, agrotóxico, praguicida e biocida também são nomes comumente dados aos pesticidas, utilizados pelo setor industrial, por agricultores, ecologistas e pesquisadores²⁰.

No Brasil, a Lei N^o 7.802, de 11 de julho de 1989, define agrotóxicos e afins no seu artigo 2^o, parágrafo I, inciso (a): “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

No termo agrotóxico estão também incluídos os desfolhantes, dessecantes, reguladores de crescimento de plantas e insetos, e são desconsiderados os medicamentos de uso veterinário, fertilizantes (ou nutrientes) e agentes de controle biológico²¹.

Seguindo a definição da lei, todos os produtos são classificados não por sua origem, e sim de acordo com sua finalidade, que é o controle de seres nocivos. Sendo assim, tanto os agroquímicos sintéticos quanto os de origem natural e até geneticamente modificados são enquadrados nessa lei, e seguem o Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2002²² que regulamenta a lei e estabelece condições para produção, manipulação, comercialização etc. O registro e avaliação de agroquímicos no Brasil está sob responsabilidade do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA)²³.

A classificação dos pesticidas é feita levando-se em conta alguns detalhes quanto ao seu raio de ação e objetivo. Inseticidas são usados para erradicar insetos, fungicidas para fungos, herbicidas para plantas daninhas, rodenticidas para eliminar roedores, acaricidas para ácaros entre outros. De acordo com as características químicas e estruturais, tais compostos também são agrupados em organoclorados, organofosforados, s-triazinas, carbamatos, uréias substituídas, fenoxiácidos, acetanilidas, sais de amônio e piretróides²⁴.

A divisão entre os pesticidas comerciais se dá aproximadamente da seguinte maneira, 60% são herbicidas, 25% inseticidas e 15% fungicidas. Os pesticidas são muito utilizados na agricultura na tentativa de se obter uma colheita mais produtiva, mas apesar de sua intensa utilização, ainda é grande o percentual de perdas, chegando a cerca de 37% da produção total, onde a ação de insetos indesejáveis responde por cerca de 13%, patógenos 12%, e plantas daninhas 12%²⁵.

O uso dos pesticidas cresceu muito a partir da segunda guerra mundial e está estreitamente ligado às mudanças introduzidas nos modelos de produção e cultivo, que ampliaram muito a produtividade agrícola sem proporcional aumento de área plantada.

No início de seu uso, os pesticidas foram responsáveis por boa parte desse aumento de produção, pois eliminando as pragas, melhoravam muito as chances de se obter uma boa colheita⁴, hoje a situação é bem diferente segundo Hawken⁶, que mostra que o uso de pesticidas sintéticos aumentou cerca de 20 vezes desde meados do século XX, e as perdas totais na produção esperadas devido aos insetos, que deveriam diminuir com uso de agroquímicos, aumentou de 7% para cerca de 13% em todo o mundo, chegando a 20% nos Estados Unidos.

O composto dicloro-difenil-tricloroetano, mais conhecido como DDT, surgiu na década de 40, logo após a Segunda Guerra Mundial, como uma solução para muitos problemas. Foi tamanha sua capacidade de acabar com as pragas, tão rapidamente e sem efeitos danosos aparentes, que valeu ao entomologista suíço Paul Hermann Müller o prêmio Nobel de medicina (1948) devido à sua descoberta das propriedades inseticidas relativas ao DDT⁷.

Movimentos contrários à intervenção química na agricultura já existiam desde que essa prática se iniciou, porém críticas mais expressivas começaram a surgir e demonstrar a relevância dos problemas causados pelo novo padrão produtivo. Em 1962, o lançamento do livro *primavera silenciosa*, da bióloga norte americana Rachel Carson⁸, denunciava os problemas causados pelo uso indiscriminado de pesticidas, sendo o maior deles o DDT, que atualmente é

proibido em mais de 80 países. Seu uso ainda é permitido em alguns lugares no combate a insetos transmissores de doenças tropicais como malária.

Os prejuízos ambientais causados estão quase em equilíbrio com os benefícios que os pesticidas trouxeram e ainda trazem à produção agrícola e ao combate de enfermidades humanas.

No início de seu uso, a eficácia em combater doenças como malária, febre amarela, dengue e outras parasitoses desencadeou o uso abusivo destes produtos em todo o mundo, e a proliferação destes insumos passou a afetar além das espécies alvo, também o ambiente, contaminando solos, água, alimentos, animais e aves, chegando desta forma ao homem, uma vez que os compostos e misturas são tóxicos, possuindo alto grau de estabilidade química e sendo bioacumulados^{3,7,8}.

Organizações internacionais de controle ambiental e saúde pública entre outras, estão sempre preocupadas e determinadas a controlar o poder destrutivo desses produtos, criando regulamentações tanto para a utilização quanto para o controle da produção, estocagem e liberação de herbicidas.

O Código Internacional de Conduta sobre Distribuição e Uso de Pesticidas foi aprovado pelo Conselho da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), que fala sobre a responsabilidade dos governos na regulamentação dessas substâncias, a necessidade de ajuda a países com dificuldades técnicas para assumirem os riscos de sua utilização, e da importância de contar com boas práticas de produção e comercialização¹⁵.

1.2. Herbicidas

O processo fitossanitário na agricultura, assim como os primeiros produtos utilizados começam a existir a partir da intensificação da própria agricultura. Os primeiros exemplos de herbicidas conhecidos foram produtos inorgânicos (enxofre e cobre) e alguns ácidos. Sulfato de cobre tem ação fungicida e uma mistura de sulfato de cobre e carbonato de amônio é utilizada na horticultura.

Seu uso como herbicida não está relacionado com a agricultura, mas sim no controle de plantas aquáticas exóticas e raízes de outras plantas invasivas próximas a encanamentos contendo água. A maior parte das espécies de algas pode ser controlada com uma concentração baixa de sulfato de cobre²⁶.

O uso de fel de lagarto verde na proteção de maçãs, extratos de pimenta, tabaco, vinagre, aguarrás, óleo de peixe, entre outros, são exemplos de agroquímicos utilizados na época de Plínio, o Ancião (23-79 d.C), catalogados em seu livro chamado História Natural²⁷.

Os herbicidas apresentam algumas características próprias como, atividade, uso, modo e mecanismo de ação, grupo químico ou tipo de vegetação controlada, características essas que direcionam e determinam o modo como serão utilizados, o tipo de alvo que atingirão, e como esse alvo será afetado pelos mesmos.

A escolha do herbicida adequado dependerá diretamente dessas características, assim como o resultado de sua ação sobre o alvo e a cultura onde será aplicado.

A atividade de um herbicida determina basicamente a região onde o mesmo atuará na planta; herbicidas de contato são os que agem apenas na área onde são aplicados; herbicidas sistêmicos apresentam a capacidade de atuar ou ter controle em toda a planta.

A absorção do herbicida é o que determinará sua atividade e deslocamento na planta, a sensibilidade da mesma a este herbicida e como será a atuação sobre o metabolismo. Existe a necessidade de que este herbicida penetre na planta e chegue ao seu destino, até a organela onde irá atuar, pois o herbicida simplesmente atingir as folhas ou ser aplicado no solo não significa que sua ação será efetiva.

Sua atuação dentro da planta se dá em locais específicos, denominados sítios de ação, fazendo alterações em rotas biossintéticas e dificultando alguma função essencial ao desenvolvimento e sobrevivência da mesma¹¹.

Mecanismo de ação e modo de ação são pontos importantes de um herbicida, que ajudam a entender como a estrutura da planta é afetada pelo princípio ativo.

O mecanismo de ação diz respeito aos efeitos do herbicida sobre o metabolismo das plantas, descrevendo normalmente os locais e os eventos que promovem esses efeitos.

O resultado da seqüência destes eventos aparece na forma de sintomas externos visíveis apresentados pelas plantas em suas folhas, raízes, flores e caules. Esses sintomas, que aparecem desde o primeiro contato do herbicida com a planta até sua morte, são o que se denomina modo de ação.

Apesar de um mesmo herbicida poder influenciar os mais variados processos metabólicos dentro da planta, seu alvo freqüentemente é a

destruição das membranas dos cloroplastos, causando danos à fotossíntese e interrompendo a transformação que produz energia necessária ao seu metabolismo²⁸.

Em relação à aplicação, os herbicidas podem ser classificados de duas formas: os pré-emergentes, quando aplicados antes do plantio da cultura, e os pós-emergentes, quando aplicados após a germinação das sementes plantadas.

Para efeito de ação dos herbicidas, as plantas daninhas são discriminadas de acordo com o número de cotilédones que possuem, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, e também de acordo com o tipo de folha, que podem ser folhas largas ou folhas estreitas.

De acordo com essas características, pode-se também classificar o herbicida quanto à seletividade, que indica o tipo de planta daninha que é afetada pelo mesmo.

Herbicidas são seletivos quando atuam sobre ou afetam o desenvolvimento de apenas uma determinada espécie, sem incomodar ou tendo pouco impacto sobre as demais. São não seletivos quando sua ação é letal a todas as espécies, sejam elas plantas de folhas largas ou folhas estreitas, mono ou dicotiledôneas^{11,28}.

A Tabela III apresenta um resumo com os principais mecanismos de ação dos herbicidas e algumas características como local de aplicação, atividade, modo de translocação, tipo de plantas afetadas e região de atuação dos herbicidas^{14,30}.

Tabela II: Mapa dos herbicidas resumido³¹

Local de aplicação	Atividade e modo de translocação	Mecanismo de ação	Plantas daninhas controladas
Folhagem	Sistêmicos	Inibidores da ACCase Inibidores de ALS Inibidores de EPSPs Mimetizadores da Auxina	P PDC PD D
		Inibidores da FS I Inibidores da PROTOX	PD D
	Contato	Inibidores de GS	PDC
Solo	Móveis	Inibidores do FS II Inibidores de carotenóides	D D
	Imóveis	Inibidores da parte aérea Inibidores de mitose	PC P

P = poáceas (gramíneas); C = ciperáceas (herbáceas); D = dicotiledôneas; ACCase = enzima AcetilCoenzima A Carboxilase; GS = enzima Glutamina Sintetase; ALS = enzima Acetolactato Sintase; EPSPs = enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato Sintase; FS I e II = Fotossistema I e II; PROTOX = enzima Protoporfirinogênio Oxidase.

O fato de o desenvolvimento de uma planta daninha necessitar as mesmas condições exigidas por outras culturas gera um ambiente de competição por água, luz, nutrientes e espaço físico, ocasionando perdas na produção da cultura desejada.

As plantas daninhas interferem também no modo de colheita, pois tanto a manual quanto a mecânica são prejudicadas. Exemplos são as espécies *Mimosa invisa* (malistra ou dormideira), que fere as mãos durante a colheita manual, *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola) e *Commelina benghalensis*

(trapoeraba), que atrapalham a colheita mecânica, pois impedem a perfeita ação do maquinário utilizado⁴.

Então, diante desses fatos, trabalhou-se em medidas visando enfrentar essas duas barreiras principais. O espaço para expansão das culturas na Europa esgotou-se rapidamente, por ser limitado, e a atenção foi voltada na direção da manipulação e criação de produtos que promovessem a eliminação das pragas.

A chamada Revolução Verde fez com que tecnologia e capital atuassem diretamente no campo e na natureza, fomentando a produção de insumos industrializados, máquinas, adubos, defensivos, organismos geneticamente modificados, entre outros.

Se por um lado, esse domínio do modo de obtenção de víveres resultou no evidente melhoramento do padrão de vida, por outro, essa nova sociedade agrícola formada, produziu também grandes danos à natureza, desmatamentos da vegetação nativa para implantação de monoculturas, procurando maior quantidade com menor variedade, lançando mão do uso de produtos químicos para o controle de pragas, comprometendo e causando contaminação de solos, águas, fauna e flora⁵.

Os herbicidas atingem o homem e a outros animais pela exposição direta ou por acumulação no organismo via ingestão de alimentos e água contaminados. Essa contaminação acontece pela exposição oral, ocular, dérmica e inalação, e dependendo do grau de toxicidade, da via de intoxicação, e do tempo de exposição, produzem efeitos dos tipos agudo (danos que aparecem em menos de 24 horas, imediatamente após a exposição a uma única dose, geralmente bastante alta), crônico (surgem após longos períodos

de contato a doses de baixa concentração ou a exposições repetidas à substância) e alérgico (caracterizados por reações que algumas pessoas apresentam depois de expostas ao produto)^{7,9,10}.

Outro problema inesperado e de grande relevância é a diminuição e muitas vezes a perda total da capacidade de controle que os herbicidas sintéticos apresentam com relação às plantas alvo. A preocupação com o surgimento de plantas resistentes a herbicidas em determinadas situações, como: uso repetitivo do mesmo herbicida ou de outro com semelhante mecanismo de ação, tem sido alertada¹¹.

A resistência apresentada pelas plantas pode ser devido a fatores que fazem com que as mesmas consigam evitar que o herbicida atinja seu alvo. Reações do metabolismo das plantas à presença dos herbicidas, perda de afinidade do herbicida pelo local de ação e redução da concentração do mesmo no local de ação são alguns desses fatores^{12,13}.

O aparecimento de plantas resistentes foi relatado inicialmente no final dos anos 60, associados à aplicação de herbicidas da classe das triazinas¹¹. Registros mostram a existência de aproximadamente 197 espécies de plantas daninhas resistentes (115 dicotiledôneas e 82 monocotiledôneas), sendo 22 delas encontradas no Brasil até o ano de 2009^{13,14}.

1.3. Alelopatia

A capacidade que as plantas têm de interferir no desenvolvimento de suas semelhantes, liberando substâncias na atmosfera ou no solo, já era observada desde a Antiguidade. No século III a.C., Teofrasto recomenda na Grécia o cuidado com o cultivo de couve junto a videiras, pois substâncias voláteis liberadas pela primeira interferem negativamente no desenvolvimento da segunda.

A menção sobre esse conceito de antipatia entre plantas aparece em vários escritos da Renascença. A incompatibilidade percebida entre algumas espécies é provocada pela liberação de substâncias voláteis ou por exalação radicular de toxinas.

O pesquisador alemão Hans Molisch reuniu as palavras gregas *allélon* e *pathos* para formar o termo alelopatia, citando-o em 1937 pela primeira vez. A palavra significa prejuízo mútuo, e segundo Molisch, alelopatia é "a capacidade de as plantas, superiores ou inferiores, produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou não o seu desenvolvimento"^{31,32}.

A Sociedade Internacional de Alelopatia define alelopatia como: Ciência que estuda qualquer processo envolvendo principalmente metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos ou negativos³³.

Produtos do metabolismo secundário são produzidos pelas plantas e estocados em grande número, e quando tais compostos são posteriormente liberados para o ambiente podem interferir no desenvolvimento

de outras espécies, afetando seu crescimento e até inibindo a germinação de sementes.

O acesso de outras plantas às substâncias alelopáticas pode acontecer de diversas formas, como lixiviação dos tecidos, ação em que as toxinas são levadas das partes altas para as raízes, absorção de compostos aromáticos que volatilizam das folhas, flores, caules, exudação através das raízes, liberando grande número de compostos na rizosfera, afetando direta ou indiretamente as interações planta/planta^{34,35,36}.

São vários os estudos realizados no sentido de se conhecer as espécies com atividades alelopáticas no intuito de aplicação como bioerbicidas, conhecendo-se seus efeitos inibitórios, suas fontes e seu comportamento no ambiente³⁷.

Existem diversas interações bioquímicas que envolvem o fenômeno da alelopatia, segundo Harborne³⁸ frações voláteis contendo terpenos e sesquiterpenos resultantes do metabolismo secundário das plantas, e compostos fenólicos são os principais responsáveis pela inibição da germinação de sementes, crescimento de plantas, além de outros processos fisiológicos.

Esses compostos possuem em comum um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxila associados diretamente à estrutura cíclica. Tendem a ser solúveis em água, e podem estar ligados a açúcares, possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória, do ponto de vista farmacológico, além da capacidade de inibir atividade enzimática.³⁸

Outros compostos também encontrados em extratos vegetais são os polifenóis taninos, flavonóides, e ácidos fenólicos. Esses compostos interagem

com sistemas biológicos como bactérias e vírus, são antioxidantes e formam complexos irreversíveis com proteínas, inibindo processos enzimáticos e interferindo no desenvolvimento das plantas.³⁹

Os flavonóides são compostos derivados do núcleo flavona, sendo que as várias classes são diferenciadas entre si pelo grau de insaturação e de oxidação no seguimento dos três carbonos intermediários. São comumente extraídos de material vegetal com metanol, etanol, ou combinação destes com água.⁴⁰

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico, e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos, ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza⁴¹.

Dentre as espécies com potencial alelopático já investigado, Almeida⁴² identificou potencialidades alelopáticas nas gramíneas forrageiras *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em níveis que possibilitaram reduções expressivas na germinação de diferentes plantas. Podem ser citados também como exemplos, a marica (*Mimosa bimucronata*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e carvalho brasileiro (*Roupala brasiliensis*), entre outras.⁴³ Souza Filho⁴⁴ considera a alelopátia uma alternativa viável no manejo de plantas daninhas, devido a seu excelente potencial de interação e importância ecológica, assim como a possibilidade de fornecer novas estruturas químicas para produção de bioativos que combatam as pragas e sejam menos danosos ao ambiente.

1.4. Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

Canavalia ensiformis, conhecida comumente como feijão-de-porco, é uma planta da família *Fabaceae* muito cultivada como cobertura verde, suas raízes possuem associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio dispensando a utilização de fertilizantes nitrogenados^{35,45}, no entanto é pouco utilizada com o objetivo de formação de pastagens, pois não é muito aceita por parte dos animais.

Foi muito bem utilizado como cultura intercalar em rotação com milho e feijão caupí em plantio de coqueirais, cultivados em solos alterados de baixa fertilidade na Região do Marajó, surgindo como alternativa capaz de minimizar tanto os danos causados ao solo pela prática tradicional dos monocultivos sucessivos, como também de amortizar os custos de manutenção e investimento nas lavouras de coqueirais.⁴⁶

Segundo Correa⁴⁷, o valor principal dessa espécie aparece em sua notável rusticidade e poder de adaptação aos solos de baixa fertilidade com a propriedade de imediatamente enriquecê-los.

Vários estudos foram desenvolvidos com essa espécie de planta, como por exemplo, os trabalhos fitoquímicos realizados por Santos⁴⁸ mostrando que a *Canavalia ensiformis* é fonte de compostos das classes alcalóides, cianoglicosídeos, saponinas, terpenóides, flavonóides e taninos.⁴⁹

Santos et al⁵⁰ avaliaram o potencial alelopático de extratos obtidos das folhas de *C. ensiformis* sobre a germinação de sementes das espécies *Cassia tora* (mata-pasto), *Mimosa pudica* (malícia) e *Cassia occidentalis* (fedegoso), plantas daninhas encontradas em pastagens, concluindo que tal leguminosa

apresenta forte potencial alelopático, e que extratos obtidos com solventes de maiores constantes dielétricas foram os mais eficientes na inibição da germinação das sementes testadas.

Mendonça⁵¹ determinou os aleloquímicos de extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* via HPLC e avaliou a atividade alelopática sobre a germinação das plantas daninhas corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis*). O estudo alelopático apresentou resultados satisfatórios com relação à inibição de germinação das sementes das plantas daninhas.

1.5. Cromatografia

Pode-se dizer que a data de 21 de Março de 1903, marca definitivamente o nascimento da cromatografia, numa conferência realizada na secção de biologia da Sociedade de Ciências Naturais de Varsóvia, onde Mikhail S. Tswett demonstrou sua mais importante conclusão sobre separação de pigmentos de clorofila.

Tswett viva e metaforicamente descreveu a sua descoberta: *“Como raios luminosos num espectro, os vários componentes de uma mistura de pigmentos são separados numa coluna de carbonato de cálcio, permitindo a respectiva determinação qualitativa e quantitativa. Designo por cromatograma, a preparação obtida como resultado deste processo e a correspondente metodologia por método cromatográfico”*.⁵² Apesar do termo “croma” de seu nome, a cromatografia não trata das cores dos componentes de uma amostra,

e pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, em que os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária (geralmente de grande área) e a outra móvel (um fluido insolúvel na fase estacionária), que percola pela primeira.

A partir de então, iniciou-se o desenvolvimento da técnica analítica mais poderosa em separação, quantificação, e identificação (quando acoplada à espectrometria) dos dias atuais. É conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), quando a fase móvel é um líquido, e cromatografia gasosa (CG) quando a fase móvel é um gás.⁵³

A HPLC é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Essa técnica é utilizada pelos químicos para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos.

Flavonóides são compostos comumente analisados por HPLC, onde colunas octadecilsílica (C18) em fase reversa são as mais utilizadas. Outras técnicas como a eletroforese capilar (EC) e a CG são também utilizadas para análise de flavonóides, no entanto, em determinações via CG os compostos devem possuir características adequadas à técnica, como volatilidade (ponto de ebulição até 300 °C), serem termicamente estáveis, com massa molar menor que 500 g mol⁻¹ não apresentando grupos carboxílicos, hidroxilas ou aminas, pois estes são retidos irreversivelmente na coluna.⁴³

A não ser que sejam derivatizados, não se pode incluir nessas condições compostos das classes dos sais orgânicos e inorgânicos, aminoácidos puros, polímeros, corantes salinos, compostos iônicos e termicamente instáveis. A técnica HPLC não necessita da volatilidade, mas da

solubilidade das amostras na fase móvel e da interação com a fase estacionária.⁵³

As amostras analisadas em HPLC juntamente com suas propriedades sofrem enorme influência da fase estacionária, que participa diretamente da separação dos componentes presentes. Esta influência da fase móvel não é tão marcante na CG, onde a separação ocorre devido a interações entre as espécies analisadas e a fase estacionária. A fase móvel neste caso atua mais como veículo para o transporte da amostra pela coluna.⁵³

A capacidade de análise das técnicas é muito bem definida, tanto em termos de compostos a serem analisados, quanto em limites de detecção e quantificação. Pode-se trabalhar em HPLC com uma quantidade reduzida de material, 1 a 20 μL de amostra são suficientes para uma análise, permite separar rapidamente desde mg até centenas de mg de substâncias com muito boa resolução. Na CG, pode-se analisar amostras de 1 μL a 1 mL, permitindo separar de ng até mg de substâncias ou frações. Muito rápida para pequenos volumes com excelente resolução.⁵⁵

A preparação da amostra a ser injetada e determinada no cromatógrafo está diretamente ligada à forma de extração da mesma. Os métodos de extração variam conforme a localização da amostra na matriz e com a proposta de utilização da mesma. As técnicas de extração mais comumente utilizadas são: extração líquido-líquido, em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração com solventes orgânicos (de forma contínua ou descontínua), extração por fluido supercrítico, sonicação, headspace entre outras.⁵⁴

2. Objetivos

Este trabalho tem por objetivos:

– avaliar o potencial herbicida de extratos aquosos obtidos a partir de folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), aplicados em pós-emergência sobre as plantas daninhas corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis*), e sobre soja transgênica e soja convencional.

– Identificar e quantificar compostos fenólicos e alcalóides com caráter alelopático presentes em amostras de folhas de feijão-de-porco utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Substâncias padrão de referencia, solventes e outros materiais

A Tabela IV apresenta os padrões, solventes e outros materiais utilizados no trabalho.

Tabela III: Padrões, solventes e outros materiais utilizados neste trabalho

Padrões	Solventes e soluções
. Ácido clorogênico (Fluka)	. Água Milli-Q – Sistema Millipore Waters
. Ácido ferulico (Fluka)	. Acetonitrila – Mallinckrodt (grau HPLC)
. Ácido p-anísico (Acros)	. Metanol – Tedia (grau HPLC)
. Naringina (Fluka)	. Hidróxido de sódio - Synth
. Rutina (Acros)	. Cloreto de potássio - Synth
Outros materiais	
. Nistatina	. Filtro seringa 0,45µm (Minisart RC 15)
. Nitrogênio ultra puro	. Papel de filtro comum
. Solo	. Seringa 50 µL HPLC – HAMILTON

3.1.2. Equipamentos

Rotaevaporador – FISATOM Mod. 557.
Ultrassom – BRANSON 2510
Sistema HPLC Shimadzu
Moinho de facas – Willey
Espectrofotômetro UV-Vis-Jasco V-630
pHmetro – pH Meter Tec-2 – TECNAL
Balança analítica – SCIENTECH AS 210
Balança Semi Analítica – BG 1000 GEHAKA
Estufa – QUIMIS
Dispositivo clevenger modificado
Aquecedor fundo redondo – 1000 mL

3.2. Métodos

3.2.1. Local, cultura e condições gerais do experimento

Tanto as sementes quanto as folhas de feijão-de-porco utilizadas no trabalho foram coletadas de amostras cultivadas no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos – USP. As amostras foram plantadas em caixas de 1 m³ utilizando-se solo retirado de área para plantação de soja, encontrado na região da cidade de São Carlos, localizado à latitude 22° 0' 41.60" S, longitude 47° 59' 7.30" W. Os dados da caracterização físico-química do solo são apresentados nas Tabelas V e VI, demonstrando que o solo é classificado como argila siltosa marrom avermelhado escuro. Este solo foi utilizado no plantio do feijão-de-porco, assim como para as amostras de plantas daninhas e de soja, onde foram aplicados os extratos avaliados.

Tabela IV: Caracterização física do solo utilizado

Areia %	Silte %	Argila %	Textura
22	34,9	43,1	Argilo-siltosa

Tabela V: Caracterização química do solo utilizado

pH (CaCl ₂) ^a	Carbono orgânico (g.kg ⁻¹)	Umidade (%) ^b	Teor de matéria orgânica (%) ^c	CTC (cmol _c kg ⁻¹) ^d
4,87	14,27	11,36	4,14	12,02

^a: determinação da atividade hidrogeniônica (25 mL de solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹ e 10 g de amostra). ^b: em estufa a 65 e 110 °C. ^c: calcinação em mufla a 500 °C por 4 h. ^d: suspensão em CH₃COOH.

As amostras de folhas e sementes de feijão-de-porco foram coletadas no mês de janeiro de 2009, secas a 40 °C em estufa com circulação de ar forçada

e posterior trituração em moinho de facas, obtendo-se aproximadamente 450g de folhas e 650g de sementes.

As sementes das plantas daninhas trapoeraba e corda-de-viola foram adquiridas junto à empresa Agrocósmos, localizada na cidade de Campinas, e as sementes de soja foram cedidas pela Embrapa soja (CNPSo), do Paraná. O material foi acondicionado em recipientes plásticos aguardando o momento de utilização.

3.2.2 Obtenção dos extratos aquosos de folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

Os extratos aquosos das folhas e sementes de feijão-de-porco foram obtidos seguindo o procedimento realizado por Santos⁴⁸ e Mendonça⁵¹, colocando-se uma massa de material vegetal colhido (folhas e sementes) previamente seco e moído em água sob agitação por um tempo determinado.

A uma massa de 300 g deste material, adicionou-se 1 L de água (0,1% KCl) purificada por processo Milli-Q, deixando sob agitação por 24 horas. A seguir a solução formada foi filtrada em tecido de algodão, adicionando-se novamente 1 L de água purificada, mantendo-se a agitação por mais 24 horas, sempre a temperatura ambiente.

Finalizando as 48 horas, filtrou-se em tecido de algodão a última parcela de material em agitação, somando com o filtrado anterior e resultando em um volume líquido final de aproximadamente 1700 mL, descontadas as perdas por evaporação e transferência de recipiente. Esse volume foi levado a um

rotaevaporador (45 °C) para retirada da água, a fim de obter-se a massa total do extrato concentrado.

A massa restante obtida após a concentração em rotaevaporador, uma massa gelatinosa, foi então pesada e, a partir daí foram preparados os extratos aquosos adicionando-se novamente água purificada, nos volumes necessários para obter-se as concentrações desejadas, 10, 25 e 50 g L⁻¹. O volumes preparados foram acondicionados em recipiente de vidro âmbar e guardados em geladeira. As massas obtidas e os volumes preparados estão dispostos na Tabela VII.

Tabela VI: Massas de extratos aquosos obtidas a partir de 300g de material vegetal previamente seco e moído

Material vegetal	Massa obtida (g)	Volumes H₂O adicionados (mL)	Concentrações obtidas (gL⁻¹)
Folhas	25,00	500,00	50,00
Sementes	20,00	400,00	50,00

A partir da concentração 50 g L⁻¹, foram preparadas as demais concentrações mediante diluição. Um fato a se notar foi a diferença entre as águas utilizadas na diluição. A princípio utilizou-se água purificada por processo Milli-Q na preparação do extrato para os primeiros ensaios, a seguir utilizou-se água diretamente da torneira, e uma terceira preparação foi feita com a água retirada da amostra no rotaevaporador.

Não houve qualquer diferença nos resultados observados com relação aos efeitos do extratos sobre as plantas daninhas. Qualquer que seja a água utilizada para preparação da calda de aplicação, os resultados, os efeitos e o tempo de ação do extrato são idênticos.

3.2.2.1. Terminologia utilizada

Foram aplicados os extratos da semente de feijão-de-porco em três diferentes concentrações, 10, 25 e 50 g L⁻¹ que foram identificadas como ES-10, ES-25 e ES-50, em que E significa 'Extrato', S significa 'Semente', e os valores 10, 25 e 50 correspondem às concentrações preparadas. A terminologia aplicada aos extratos de folha de feijão-de-porco foi idêntica, com 'S' (semente) substituído por 'F' (folha).

Cada um dos extratos preparados nas diferentes concentrações foi denominado de tratamento e a unidade experimental contendo as plantas daninhas onde se aplicou o tratamento foi denominada de parcela.

3.2.3. Procedimento de Aplicação dos extratos

O experimento foi conduzido no período de março a maio de 2009, no Laboratório de Química Ambiental (IQSC-USP), na cidade de São Carlos-SP. As aplicações foram feitas por volta das 10 horas da manhã, com temperaturas variando entre 22 e 28 °C. Para a aplicação dos extratos, as sementes das plantas daninhas e da soja foram plantadas em recipientes plásticos de 15 cm de diâmetro.

Foram feitos vários testes, sendo que o número de sementes e a combinação entre elas em cada recipiente variou, objetivando-se avaliar a ação dos extratos tanto nas sementes das plantas isoladas quanto em conjunto com a soja.

O momento das aplicações dos tratamentos deu-se a partir da germinação das sementes das plantas daninhas, no 8º dia do plantio para trapoeraba e a partir do 5º dia para corda-de-viola (Mendonça, 2007).⁵¹

Foram escolhidos três diferentes períodos de tempo para aplicação dos diferentes tratamentos:

- 1ª aplicação: logo após sua germinação;
- 2ª aplicação: 15 dias após a germinação;
- 3ª aplicação: 30 dias após a germinação,

estando as plantas, nessas condições, em diferentes tamanhos e idades em cada aplicação.

A ação dos tratamentos foi observada durante 3 a 5 dias até o máximo de 7 dias. O comportamento e o desenvolvimento da planta sob ação dos tratamentos foram observados durante todo o período das aplicações, e foi dada, também, atenção ao período de 10 dias após a última aplicação, com objetivo de observar uma eventual recuperação da planta. Os resultados foram comparados com uma amostra controle, preparada nas mesmas condições, sem, no entanto receber os extratos.

As formas de aplicação de herbicidas em ensaios são normalmente a utilização de um pulverizador costal pressurizado, veículos tracionados ou puxados por trator e até mesmo aeronaves, adequados ao trabalho, dependendo do tamanho e condições da área preparada. Neste experimento, cada unidade experimental constou de um recipiente plástico de pequeno porte (1 litro) preenchido com solo, não exigindo aparato sofisticado para a aplicação dos tratamentos. Para tanto, a aplicação foi realizada com auxílio de um

dispositivo tipo spray que lança o extrato líquido simulando um pulverizador, sendo cada borrifada do dispositivo equivalente a um volume de 700 μL .

3.2.4. Extração das amostras e condições para análise cromatográfica

Foi feito um trabalho de identificação de compostos fenólicos em amostras de folhas de feijão-de-porco utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência. Esses compostos foram escolhidos a partir de estudos realizados anteriormente por Santos⁴⁸ e Mendonça.⁵¹ Os componentes das folhas de feijão-de-porco foram submetidas à extração por meio de dispositivo cleverger, ao qual se juntou 200 mL de água purificada por processo Milli-Q e uma massa de 20 g de folhas secas e moídas.

O conjunto foi mantido em aquecimento (100 °C) por 4 horas, e após este período o volume de água contendo o material extraído das folhas, cerca de 8 mL, foi separado e trabalhou-se na preparação das amostras para injeção no cromatógrafo. O volume foi filtrado em filtro seringa Minisart RC 15 com 45 μm e dividido em duas partes, as quais foram concentradas em atmosfera de nitrogênio até que atingissem aproximadamente 1 mL cada. A partir disso, uma amostra chamada amostra aquosa, foi mantida sem alteração, contendo somente água, e injetada diretamente no cromatógrafo. À segunda parte da amostra chamada hidroalcoólica, foi adicionado 1 mL de metanol, solvente com o qual os compostos procurados tem afinidade, segundo Santos⁴⁸ e Mendonça⁵¹. As amostras foram preparadas em triplicata, fazendo-se três injeções para cada triplicata.

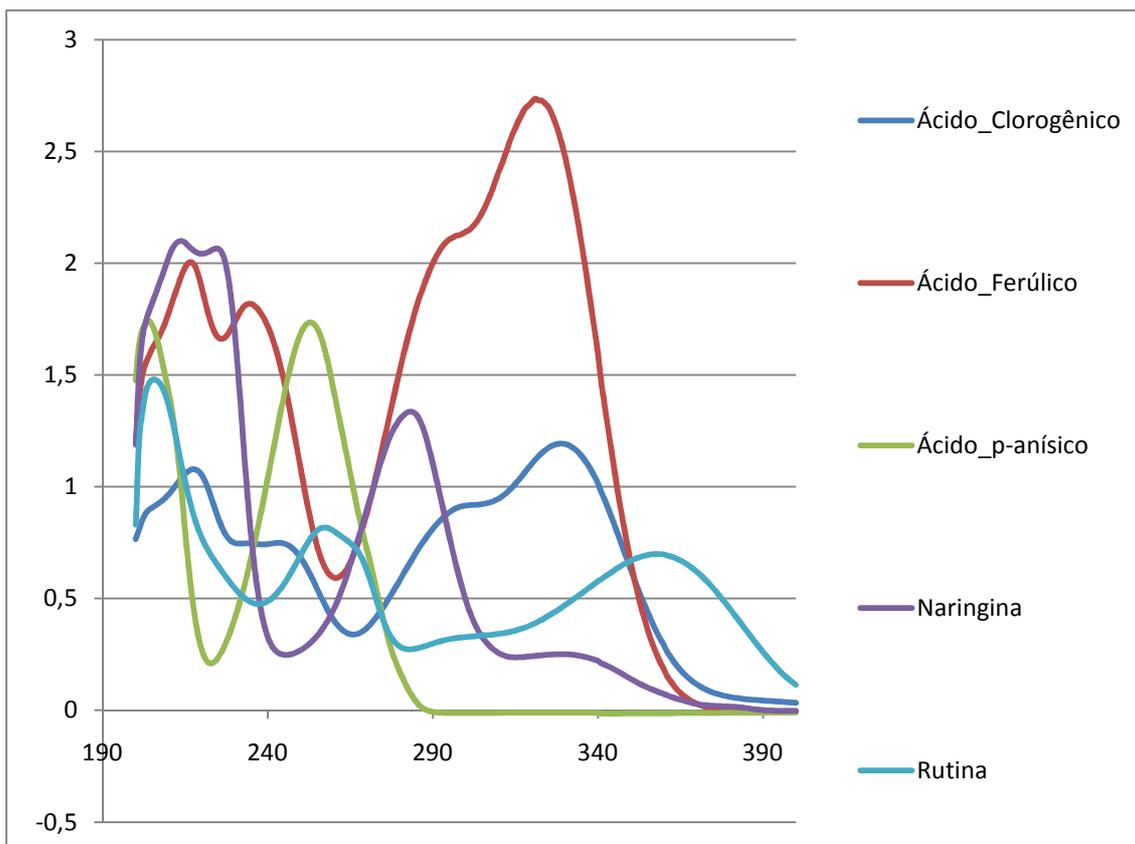


Figura I: Espectros na região do UV-Vis para os compostos padrão utilizados no trabalho

Tabela VII: Condições cromatográficas empregadas nas análises das amostras de folhas de feijão-de-porco

Coluna	STR ODS – II
Comprimento (L)	15,0 cm
Diâmetro Interno (di)	4,6 mm
Diâmetro da Partícula (μm)	5,0 μm
Fase Móvel	A: HCOOH (2% em H ₂ O, pH 3), B: ACN
Fluxo da fase móvel	0,8 e 1 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	33 °C
Volume Injetado (amostra)	20 μL
Detector	UV-Vis
Comprimentos de onda monitorados	$\lambda = 250, 265, 290 \text{ e } 340 \text{ nm}$

Foram utilizadas substâncias padrão de referência para estes compostos, preparadas em várias concentrações, e seus resultados cromatográficos comparados aos resultados das amostras extraídas das folhas de feijão-de-porco.

A análise foi feita levando-se em consideração os comprimentos de onda de absorbância das substâncias padrão na região do UV-Vis, e a Figura I mostra os gráficos espectrofotométricos com uma varredura de comprimentos de onda entre 200 e 400 nm para as substâncias padrão utilizados na comparação com as amostras.

As condições cromatográficas utilizadas na análise das amostras são apresentadas na Tabela VIII.

4. Resultados e Discussão

4.1. Experimentos utilizando extratos de folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

Um dos objetivos deste trabalho foi comprovar a capacidade herbicida e seletividade de extratos preparados a partir de feijão-de-porco e aplicados em pós-emergência sobre cultivares de soja e plantas daninhas. Nesta etapa, foram preparados extratos de diferentes concentrações a partir de folhas e sementes de Feijão-de-Porco e os extratos aplicados em amostras de soja transgênica (cultivar CD 214RR), soja convencional (BRS-133 e MG/BR 46 Conquista) e as plantas daninhas trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*), sendo a aplicação realizada em diferentes volumes, concentrações e períodos de tempo após a germinação das sementes.

4.1.1. Avaliação dos efeitos observados

A avaliação utilizada para definir a toxicidade dos tratamentos foi baseada numa escala conceitual alfabética (Tabela IX) da Sociedade Brasileira Da Ciência Das Plantas Daninhas – SBCPD⁵⁶, que variou de “a” até “e”, com descrição detalhada dos sintomas apresentados pelas plantas ao final da aplicação dos tratamentos.

Tabela VIII: Descrição dos conceitos aplicados as avaliações de toxicidade – SBPCD⁵⁶

Conceito	Descrição
a	Sem injúria ou efeito sobre a cultura.
b	Injúrias leves e/ou redução de crescimento com rápida recuperação.
c	Injúrias moderadas e/ou reduções de crescimento com lenta recuperação ou definitivas.
d	Injúrias severas e/ou reduções de crescimento não recuperáveis e/ou reduções de estande.
e	Destruição completa da cultura ou somente algumas plantas vivas.

As avaliações da porcentagem de controle realizadas após a aplicação dos extratos foram baseadas na escala de notas da 'Asociacion Latino Americana de Malezas' (ALAM), *(1974 apud CHIOVATO⁵⁷, 2009, p. 35-38) descritas na Tabela X. Os resultados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F a 1%.

Tabela IX: Escala de conceitos da ALAM* utilizada para avaliação da porcentagem de eficácia de controle de plantas daninhas

Porcentagem (%)	Descrição do nível de controle
0 – 40	Nenhum ou pobre
41 – 60	Regular
61 – 70	Suficiente
71 – 80	Bom
81 – 90	Muito bom
91 – 100	Excelente

4.1.2. Avaliação do volume ótimo para aplicação

Buscando-se um volume adequado para o controle das plantas daninhas, os tratamentos foram preparados em 6 diferentes concentrações previamente estabelecidas e aplicados de diferentes modos.

Para início, aplicou-se o volume de 700 $\mu\text{L}/\text{dia}/\text{planta}$, até que o desenvolvimento da planta fosse totalmente interrompido e a planta morresse. Apenas 2 das 6 concentrações demonstraram resultado desejado, as concentrações 25 e 50 g L^{-1} do extrato da semente, que após cinco aplicações seguidas, ou 3,5 mL/planta de extrato, comprovou a eficiência e a planta foi totalmente controlada (morta), em todos os períodos de aplicação. O resultado foi novamente alcançado após os mesmos cinco dias, aplicando-se o tratamento em dose única.

As Tabelas XI a XVI apresentam o resultado visual obtido após a aplicação dos tratamentos, assim como as variações para volume e modo de aplicação utilizados na escolha do volume a ser aplicado.

Os dados apresentados são relativos somente às concentrações 25 e 50 g L^{-1} devido ao interesse maior nas concentrações que conseguem interromper o desenvolvimento das amostras de estudo. Ainda de acordo com as observações, nenhum volume abaixo de 3,5 mL/planta aplicado apresentou essa capacidade em qualquer dos períodos escolhidos para aplicação, sendo este o volume adequado para o controle.

Tabela X: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em dose única

Tratamento	Dose por planta	Modo de aplicação	corda-de-viola		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 μL	Dose única	d	c	c
ES-50	2800 μL	Dose única	e	e	d
ES-25	1500 μL	Dose única	b	a	b
ES-50	1500 μL	Dose única	d	c	d
ES-25	1000 μL	Dose única	a	a	a
ES-50	1000 μL	Dose única	b	b	b
ES-25	700 μL	Dose única	a	a	a
ES-50	700 μL	Dose única	b	a	b
ES-25	500 μL	Dose única	a	a	a
ES-50	500 μL	Dose única	a	a	a

Tabela XI: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em duas etapas, sendo a 2ª aplicada 3 dias após a 1ª

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	corda-de-viola		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 µL	Duas aplicações, sendo a 2ª aplicada 3 dias após a 1ª	d	d	c
ES-50	2800 µL		e	e	d
ES-25	1500 µL		c	b	c
ES-50	1500 µL		d	c	d
ES-25	1000 µL		a	a	a
ES-50	1000 µL		b	b	b
ES-25	700 µL		a	a	a
ES-50	700 µL		b	a	a
ES-25	500 µL		a	a	a
ES-50	500 µL		a	a	a

Tabela XII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre corda-de-viola em 5 doses

Tratamento	Dose por planta	Modo de aplicação	corda-de-viola		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 µL	5 doses	d	d	c
ES-50	2800 µL		e	e	d
ES-25	1500 µL		c	b	c
ES-50	1500 µL		d	c	d
ES-25	1000 µL		a	a	a
ES-50	1000 µL		b	b	b
ES-25	700 µL		a	a	a
ES-50	700 µL		b	a	a
ES-25	500 µL		a	a	a
ES-50	500 µL		a	a	a

Tabela XIII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em dose única

Tratamento	Dose por planta	Modo de aplicação	trapoeraba		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 µL	Dose única	c	b	c
ES-50	2800 µL	Dose única	d	d	c
ES-25	1500 µL	Dose única	b	a	b
ES-50	1500 µL	Dose única	c	b	c
ES-25	1000 µL	Dose única	a	a	a
ES-50	1000 µL	Dose única	b	b	b
ES-25	700 µL	Dose única	a	a	a
ES-50	700 µL	Dose única	b	a	b
ES-25	500 µL	Dose única	a	a	a
ES-50	500 µL	Dose única	a	a	a

Tabela XIV: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em duas etapas, sendo a 2ª aplicada 3 dias após a 1ª

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	trapoeraba		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 µL	Duas aplicações, sendo a 2ª aplicada 3 dias após a 1ª	d	d	d
ES-50	2800 µL		e	e	e
ES-25	1500 µL		c	c	c
ES-50	1500 µL		d	c	d
ES-25	1000 µL		a	a	a
ES-50	1000 µL		b	b	b
ES-25	700 µL		a	a	a
ES-50	700 µL		b	b	b
ES-25	500 µL		a	a	a
ES-50	500 µL		a	a	a

Tabela XV: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para os diferentes volumes aplicados sobre trapoeraba em 5 doses

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	trapoeraba		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
ES-25	2800 µL	5 doses	d	d	d
ES-50	2800 µL		e	e	e
ES-25	1500 µL		c	c	c
ES-50	1500 µL		d	c	d
ES-25	1000 µL		a	a	a
ES-50	1000 µL		b	b	b
ES-25	700 µL		a	a	a
ES-50	700 µL		b	b	b
ES-25	500 µL		a	a	a
ES-50	500 µL		a	a	a

Após estes testes, verificou-se que a variação no modo de aplicação não é fator relevante que influencie o resultado da ação dos tratamentos sobre os alvos, e que o limite mínimo de volume a ser aplicado para obtenção do controle desejado é de 3,5 mL. Assim, fica claro que os tratamentos com concentrações 25 e 50 g L⁻¹ são os que tem maior poder de controle sobre o desenvolvimento das plantas em estudo, sendo o volume ótimo de aplicação 3,5 mL/planta, e a aplicação em dose única a recomendada.

4.2. Avaliação dos dados obtidos após aplicação dos extratos

4.2.1. Avaliação dos tratamentos aplicados sobre corda-de-viola

Antes de colocar as sementes nos recipientes onde seriam aplicados os tratamentos, as mesmas foram acondicionadas em placa de Petri com papel de filtro e Nistatina (para evitar proliferação de fungos) por alguns dias, até o início da germinação, sendo a seguir transferidas para os recipientes que formariam as parcelas e o controle (branco). Os tratamentos foram preparados alguns dias antes da aplicação, e nas épocas pré-definidas foram aplicados de acordo com os volumes e os modos de aplicação estabelecidos. Os resultados das avaliações de toxicidade (segundo SBCPD)⁵⁶ e porcentagem de controle (segundo ALAM)* realizadas após a aplicação dos extratos estão dispostos nas Tabelas XVII e XVIII.

Tabela XVI: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, dos efeitos dos tratamentos sobre corda-de-viola

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	corda-de-viola		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
EF-10	3500 µL	Dose única	a	a	a
		5 doses (700µL)	a	a	a
EF-25	3500 µL	Dose única	a	a	a
		5 doses (700µL)	a	a	a
EF-50	3500 µL	Dose única	b	b	b
		5 doses (700µL)	b	b	b
ES-10	3500 µL	Dose única	b	b	b
		5 doses (700µL)	b	b	b
ES-25	3500 µL	Dose única	d	c	d
		5 doses (700µL)	d	c	d
ES-50	3500 µL	Dose única	e	e	e
		5 doses (700µL)	e	e	e

Os dados da Tabela XVII demonstram que tratamentos ES-25 e ES-50 preparados com a semente de feijão-de-porco são os mais eficientes na interrupção do desenvolvimento das plantas daninhas. Os dados da Tabela XVIII trazem as porcentagens de controle dos tratamentos, corroborando com os dados da tabela anterior, que demonstram o poder de controle dos tratamentos preparados a partir de sementes. Os tratamentos preparados a partir das folhas apresentaram resultados de controle parcial sobre o alvo, não interrompendo seu desenvolvimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e aplicado o teste F a 1% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, sendo o caso dos tratamentos EF-10, EF-25, EF-50 e ES-10, que demonstraram semelhança em todos os aspectos observados, inclusive análise visual de controle sobre o alvo.

Tabela XVII: Avaliação segundo ALAM, da porcentagem de controle dos tratamentos sobre corda-de-viola

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	corda-de-viola		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
EF-10	3500 µL	Dose única	10 ^a	5 ^a	10 ^a
		5 doses (700µL)	10 ^a	5 ^a	10 ^a
EF-25	3500 µL	Dose única	15 ^a	10 ^a	15 ^a
		5 doses (700µL)	15 ^a	10 ^a	15 ^a
EF-50	3500 µL	Dose única	30 ^a	20 ^a	20 ^a
		5 doses (700µL)	30 ^a	20 ^a	25 ^a
ES-10	3500 µL	Dose única	20 ^a	15 ^a	20 ^a
		5 doses (700µL)	20 ^a	20 ^a	20 ^a
ES-25	3500 µL	Dose única	90 ^b	85 ^b	95 ^b
		5 doses (700µL)	95 ^b	90 ^b	95 ^b
ES-50	3500 µL	Dose única	100 ^b	95 ^b	100 ^b
		5 doses (700µL)	100 ^b	100 ^b	100 ^b

^{ab}: Médias seguidas pela mesma letra na colunas não diferem significativamente entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

A aplicação em 0 (zero) dias foi iniciada no momento da germinação das sementes, antes que a plântula despontasse no solo. Verificou-se que a semente germinou e a plântula conseguiu crescer (ou desenvolver-se com alguma dificuldade) após a aplicação dos tratamentos EF-10, EF-25, EF-50, e também após aplicação do tratamento ES-10. Os tratamentos ES-25 e ES-50 foram os únicos a apresentar capacidade de controle total sobre as plantas daninhas no volume aplicado e nos três estádios de desenvolvimento da mesma. Nessas condições, as sementes germinadas não se desenvolveram, não havendo crescimento da planta jovem, que secou e morreu. As aplicações dos tratamentos foram realizadas de forma que os mesmos atingissem a planta em toda sua extensão, ou a maior área possível, via dispositivo aplicador expelindo um jato spray, espalhando eficientemente o tratamento por toda a área onde a planta se encontra.

O tratamento ES-50 é o mais eficiente no controle de corda-de-viola, seus efeitos começam a aparecer 24 h após a aplicação, e os sintomas se iniciam com uma leve deformação nas bordas laterais das folhas. Com 48 h, todas as folhas já apresentam sinais de deformação nas bordas, e as folhas menores já começam a murchar. Com o passar dos dias, os sinais se tornam mais e mais evidentes, as folhas começam a mudar de cor, trocando o verde por marrom, num processo muito rápido em que sua estrutura se torna murcha e seca. No quarto dia após a aplicação, as plantas já não têm mais folhas verdes, estando deformadas e marrons, e apresentando um aspecto de doentes ou completamente mortas. No quinto dia após a aplicação, as folhas da planta estão totalmente secas, o caule torna-se duro e seco, a planta já não cresce e não há possibilidade de recuperação.

4.2.2. Avaliação dos tratamentos aplicados sobre trapoeraba

As sementes de Trapoeraba foram germinadas em placa de Petri, e a seguir transferidas para as parcelas, sendo que necessitam de um tempo maior para germinarem, em relação à corda-de-viola. A partir da germinação, o procedimento seguido foi idêntico ao utilizado para Corda-de-Viola. As Tabelas XIX e XX apresentam os resultados das avaliações visuais (segundo SBCPD)⁵⁶ e porcentagem de controle (segundo ALAM) após aplicação dos tratamentos, de acordo com os modos e volumes de aplicação.

Tabela XVIII: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, dos efeitos dos tratamentos sobre trapoeraba

Tratamento	Dose por planta	Modo de Aplicação	trapoeraba		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
EF-10	3500 µL	Dose única	a	a	a
		5 doses (700µL)	a	a	a
EF-25	3500 µL	Dose única	b	a	a
		5 doses (700µL)	b	a	a
EF-50	3500 µL	Dose única	c	b	b
		5 doses (700µL)	c	b	b
ES-10	3500 µL	Dose única	b	b	a
		5 doses (700µL)	b	b	a
ES-25	3500 µL	Dose única	e	e	d
		5 doses (700µL)	e	e	d
ES-50	3500 µL	Dose única	e	e	e
		5 doses (700µL)	e	e	e

A Tabela XIX apresenta os resultados das avaliações visuais (segundo SBCPD)⁵⁶ após aplicação dos tratamentos, de acordo com os modos e volumes de aplicação. Os resultados apresentados para os ensaios realizados com trapoeraba demonstram que não houve diferença significativa dos efeitos obtidos para corda-de-viola, de acordo com a avaliação visual e que mais uma

vez os tratamentos ES-25 e ES-50 são os mais eficientes no controle da planta daninha.

No entanto, a avaliação visual não demonstra diferença entre os modos de aplicação, não sendo os mesmos um fator importante no resultado final. A Tabela XX traz as porcentagens de controle dos tratamentos, demonstrando que, de acordo com as observações visuais, apenas os tratamentos ES-25 e ES-50 apresentam poder de controle total sobre o alvo.

Tabela XIX: Avaliação segundo ALAM, da porcentagem de controle dos tratamentos sobre trapoeraba

Tratamento	Dose por Planta	Modo de aplicação	trapoeraba		
			Época de avaliação (dias)		
			0	15	30
EF-10	3500 µL	Dose única	10 ^a	5 ^a	10 ^a
		5 doses (700µL)	10 ^a	5 ^a	10 ^a
EF-25	3500 µL	Dose única	15 ^a	10 ^a	15 ^a
		5 doses (700µL)	15 ^a	10 ^a	15 ^a
EF-50	3500 µL	Dose única	30 ^a	20 ^a	20 ^a
		5 doses (700µL)	30 ^a	20 ^a	25 ^a
ES-10	3500 µL	Dose única	20 ^a	15 ^a	20 ^a
		5 doses (700µL)	20 ^a	20 ^a	20 ^a
ES-25	3500 µL	Dose única	90 ^b	80 ^b	95 ^b
		5 doses (700µL)	95 ^b	90 ^b	95 ^b
ES-50	3500 µL	Dose única	100 ^b	95 ^b	100 ^b
		5 doses (700µL)	100 ^b	100 ^b	100 ^b

^{ab}: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

As aplicações seguiram o mesmo procedimento, sendo 0 (zero) dias iniciado no momento da germinação das sementes, antes que a plântula despontasse no solo. O resultado demonstrou que tanto trapoeraba quanto corda-de-viola tiveram ou sofreram os mesmos efeitos quando submetidas aos tratamentos. A semente germinou e a plântula conseguiu crescer (ou desenvolveu-se com alguma dificuldade) após a aplicação dos tratamentos EF-

10, EF-25, EF-50 e também ES-10, sendo igualmente ineficientes para o controle total da Trapoeraba nos períodos e volumes aplicados.

Os tratamentos ES-25 e ES-50 foram os únicos a apresentar eficiência para controlar a Trapoeraba no volume aplicado e nos três estádios de desenvolvimento da mesma. O tratamento ES-50 é o mais eficiente no controle da planta daninha e seus efeitos começam a aparecer 24 h após a aplicação.

Diferentemente da corda-de-viola, as folhas verdadeiras da trapoeraba aparecem mais tarde, por volta dos 20 dias após a germinação, no entanto os sintomas apresentados pela planta são idênticos. Iniciam com uma leve deformação nas bordas laterais das folhas, que vai aumentando com o passar dos dias, murchando a folha que perde a coloração verde, tornando-se amarelada e marrom. Com 48 h, todas as folhas já apresentam sinais de deformação nas bordas, e as folhas menores já começam a murchar. Os sinais se tornam mais e mais evidentes, o processo de definhamento é muito rápido e a planta apresenta um aspecto de doente ou morta.

No quinto dia após a aplicação, as folhas da planta estão totalmente secas e caindo, o caule se torna duro e seco, a planta já não cresce e não há possibilidade de recuperação.

4.2.3. Avaliação da seletividade do tratamento ES-50 aplicado sobre parcelas constituídas pelas plantas daninhas e soja

Para avaliação da seletividade utilizou-se o tratamento ES-50, que foi aplicado sobre parcelas contendo as plantas daninhas utilizadas no

experimento e alguns cultivares de soja transgênica e soja convencional. As parcelas continham:

- Trapoeraba + Corda-de-Viola + Soja transgênica (CD 214-RR);
- Trapoeraba + Corda-de-Viola + Soja convencional (BRS 133);
- Trapoeraba + Corda-de-Viola + Soja convencional (MG/BR 46).

O tratamento ES-50 foi o escolhido para essa avaliação devido à sua eficiência no controle total das plantas daninhas; foi aplicado o volume de 3,5 mL/planta em dois diferentes modos de aplicação e os resultados foram observados durante o período que foi desde a primeira aplicação até 10 dias após a última aplicação. Na Tabela XXI estão dispostos os resultados da avaliação visual (segundo SBCPD) após a aplicação do tratamento seguindo os modos e volume de aplicação.

Tabela XX: Resultado das avaliações visuais segundo SBCPD⁵⁶, para o tratamento ES-50 sobre plantas daninhas e cultivares de soja

Alvos	Dose por planta	Modo de aplicação	Conceito (30 dias)
Trapoeraba	3500 µL	5 doses (700µL)	e
		Dose única	
Corda-de-Viola	3500 µL	5 doses (700µL)	e
		Dose única	
Soja (CD 214-RR)	3500 µL	5 doses (700µL)	a*
		Dose única	
Soja (BRS 133)	3500 µL	5 doses (700µL)	a*
		Dose única	
Soja (MG/BR 46)	3500 µL	5 doses (700µL)	a*
		Dose única	

a*: conceito apenas para efeitos sobre o desenvolvimento, não garante a produtividade

Os dados indicam os resultados no teste, as plantas daninhas foram totalmente controladas pelo extrato enquanto que as amostras de soja (transgênica e convencional) não demonstraram qualquer tipo de efeito relativo ao extrato no período observado. As plantas daninhas apresentaram os

mesmos sintomas assim que os efeitos do extrato se iniciaram, pequenas deformações nas laterais que rapidamente se expandiram pela folha inteira, fazendo com que a mesma murchasse e secasse completamente junto com a planta.

Os cultivares de soja se mantiveram normais durante todo o tempo de observação e cresceram tanto e tão rapidamente quanto as testemunhas utilizadas para comparação.

É importante observar que, apesar de a cultura não sofrer efeitos externos aparentes sobre seu desenvolvimento, a garantia de seletividade referida a um herbicida só pode ser emitida a partir de dados de produtividade. Se um determinado herbicida controla as pragas e permite que a cultura tenha uma produtividade similar à verificada em testemunhas capinadas, fica claro que não houve efeitos negativos e o herbicida pode ser considerado eficaz e seletivo à cultura (SBCPD).⁵⁶

4.3. Análise de Massa Seca

Após a avaliação do efeito herbicida relativo aos tratamentos, foi feita também a análise da biomassa seca das plantas daninhas, assim como a comparação com a biomassa das testemunhas. Foram utilizadas na comparação as biomassas das testemunhas verdes e das mesmas secas em estufa a 70 °C por 48 horas. Todos os valores apresentados são médias feitas a partir dos valores das massas das plantas utilizadas nas parcelas em que foram aplicados os tratamentos.

A produção de biomassa fresca da parte aérea foi reduzida em todas as parcelas quando comparadas à testemunha. Nas Tabelas XXII e XXIII apresentam-se os valores para as biomassas da testemunha e as biomassas secas das plantas, sendo as últimas obtidas no 6º dia após a aplicação dos tratamentos e biomassa da testemunha após 48 horas em estufa a 70 °C.

Tabela XXI: Biomassa seca obtida para corda-de-viola

Tratamentos	Testemunha	BS I	BS II
EF-10	5,21	5,10	0,09
EF-25	5,21	4,51	0,09
EF-50	5,21	4,40	0,09
ES-10	5,21	4,41	0,09
ES-25	5,21	0,45	0,09
ES-50	5,21	0,24	0,09

BS I = Biomassa da planta no 6º dia após aplicação do tratamento

BS II = Biomassa da testemunha após 48 h em estufa

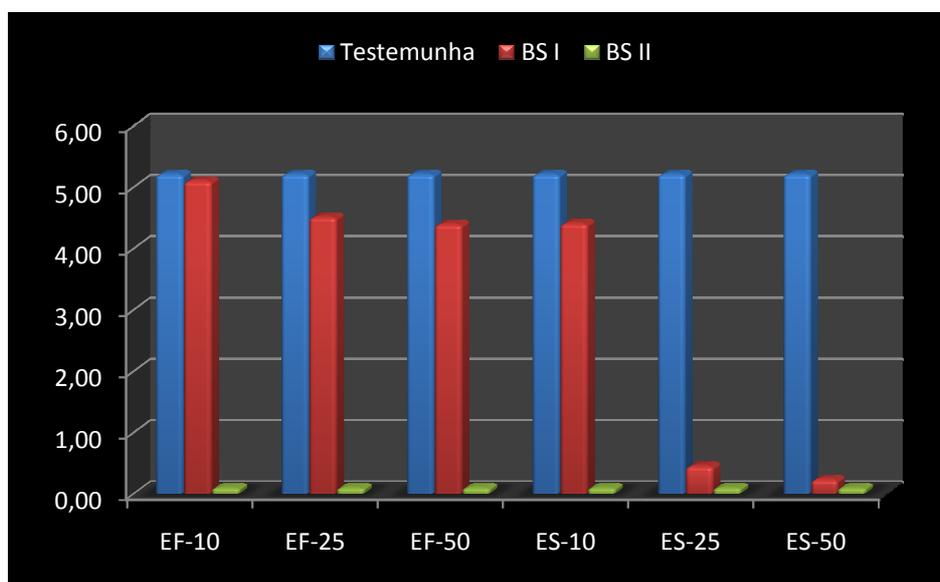


Figura II: Gráfico ilustrando a relação entre as biomassas secas de corda-de-viola

BS I = Biomassa da planta no 6º dia após aplicação do tratamento

BS II = Biomassa da testemunha após 48 h em estufa

Tabela XXII: Biomassa seca obtida para trapoeraba

Tratamentos	Testemunha	BS I	BS II
EF-10	4,11	4,01	0,20
EF-25	4,11	4,00	0,20
EF-50	4,11	3,97	0,20
ES-10	4,11	3,94	0,20
ES-25	4,11	0,47	0,20
ES-50	4,11	0,33	0,20

BS I = Biomassa da planta no 6º dia após aplicação do tratamento
 BS II = Biomassa da testemunha após 48 h em estufa

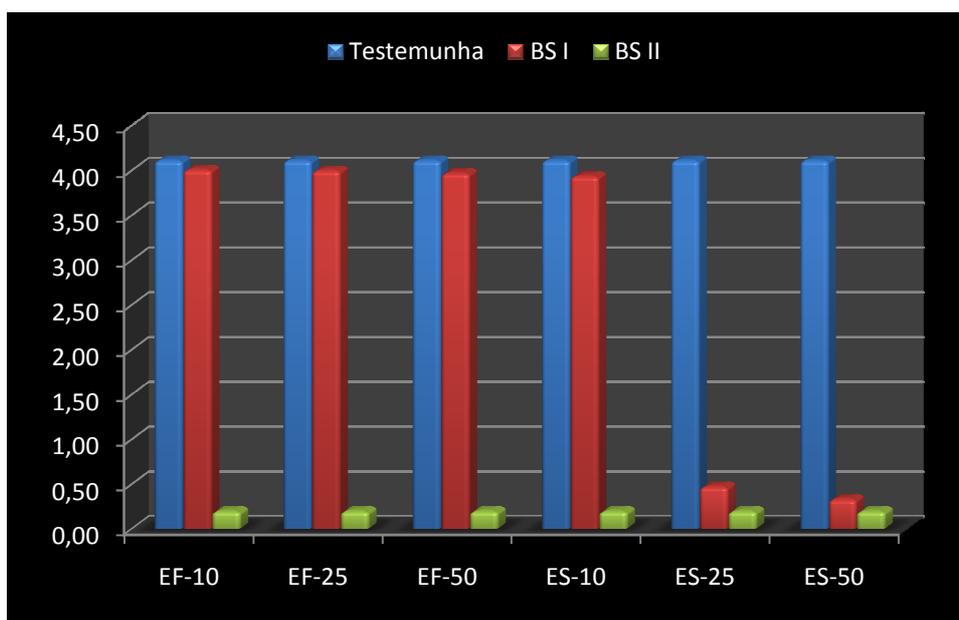


Figura III: Gráfico ilustrando a relação entre as biomassas secas de trapoeraba
 BS I = Biomassa da planta no 6º dia após aplicação do tratamento
 BS II = Biomassa da testemunha após 48 h em estufa

Pelos valores da biomassa seca pode-se verificar a ação dos tratamentos sobre as plantas daninhas, confirmando as características e capacidade de controle de cada concentração. As Figuras II e III mostram os gráficos com a relação entre as biomassas, evidenciando que os extratos ES-25 e ES-50 são os mais eficientes no controle das plantas daninhas utilizadas neste experimento. Nota-se também que quase não há diferença entre a biomassa seca dos demais tratamentos aplicados, EF-25, EF-50 e ES-10.

4.4. Análise cromatográfica via HPLC

Foram realizadas análises cromatográficas para determinação e identificação de flavonóides, alcalóides e ácidos fenólicos nas folhas de feijão-de-porco. As amostras obtidas através do método de extração clevenger foram analisadas e seus picos submetidos à comparação dos tempos de retenção com a ajuda de padrões de compostos conhecidos, cuja presença nas amostras era esperada, pois já foram encontradas e identificadas por meio de outras técnicas⁴⁸.

Além dos tempos de retenção utilizados na comparação entre amostra e padrão, as análises foram realizadas também em diferentes comprimentos de onda na região do ultravioleta-visível, o que proporcionou a seletividade entre compostos cuja proximidade dos tempos de retenção gerava dúvidas sobre sua identidade.

As amostras preparadas foram divididas em amostra aquosa e amostra hidroalcoólica, e a análise das mesmas levou à identificação de 4 compostos presentes nas folhas de feijão-de-porco. As Figuras IV a X trazem os perfis cromatográficos e a comparação com os devidos padrões de identificação.

Os tempos de retenção dos compostos ácido ferúlico e rutina são bem próximos, 20 e 21 minutos respectivamente, e seus picos podem se confundir quando estes estão presentes em uma amostra. A presença de um pico em 20 minutos na amostra aquosa gerou uma dúvida em um primeiro momento sobre que composto seria, no entanto acabou sendo identificado como rutina com a variação do comprimento de onda. A Figura IV mostra o cromatograma com a comparação dos tempos de retenção dos padrões ácido ferúlico e rutina e da

amostra hidroalcoólica analisados pelo detector UV-Vis em $\lambda = 325$ nm. Pode-se observar na figura a sobreposição entre picos a 20 minutos, dando a idéia de que o pico no cromatograma pode ser do composto ácido ferúlico.

A amostra aquosa foi analisada uma segunda vez, em $\lambda = 265$ nm, e novamente comparada aos padrões ácido ferúlico e rutina. A Figura V mostra este cromatograma com a comparação dos tempos de retenção, tornando mais fácil a definição entre os dois compostos.

Há o deslocamento do pico de 20 para 21 minutos, indicando agora tratar-se do composto rutina, e não mais do ácido ferúlico. O que confirma a hipótese é o aumento no tamanho do pico, devido à maior absorbância do composto no comprimento de onda de 265 nm.

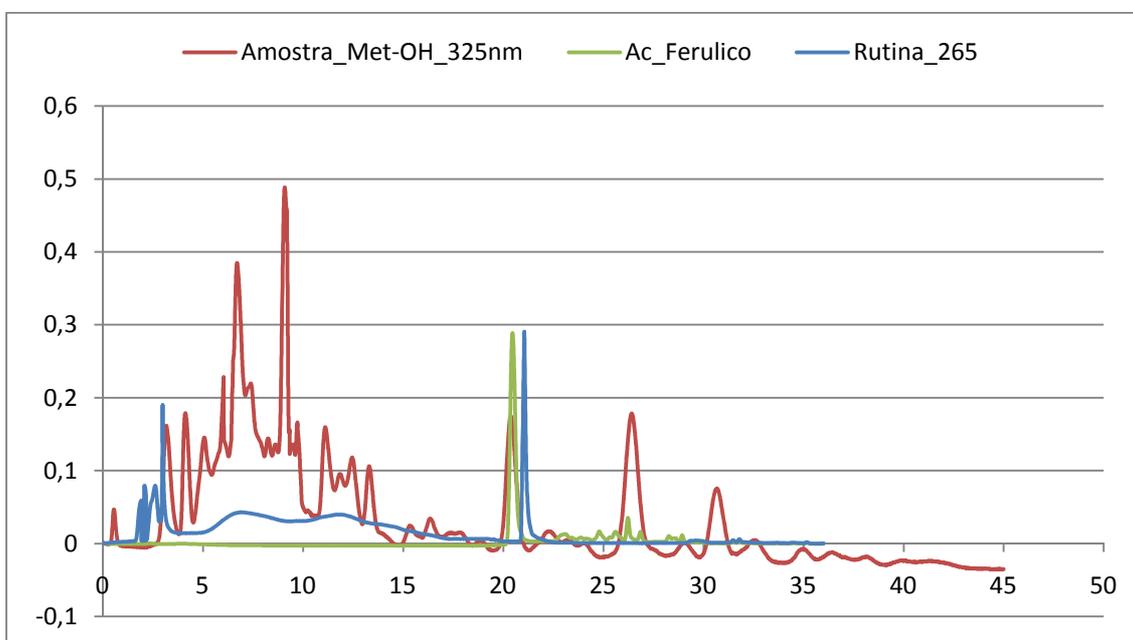


Figura IV: Cromatograma comparativo para identificação e seletividade entre os compostos rutina e ácido ferúlico em $\lambda = 325$ nm

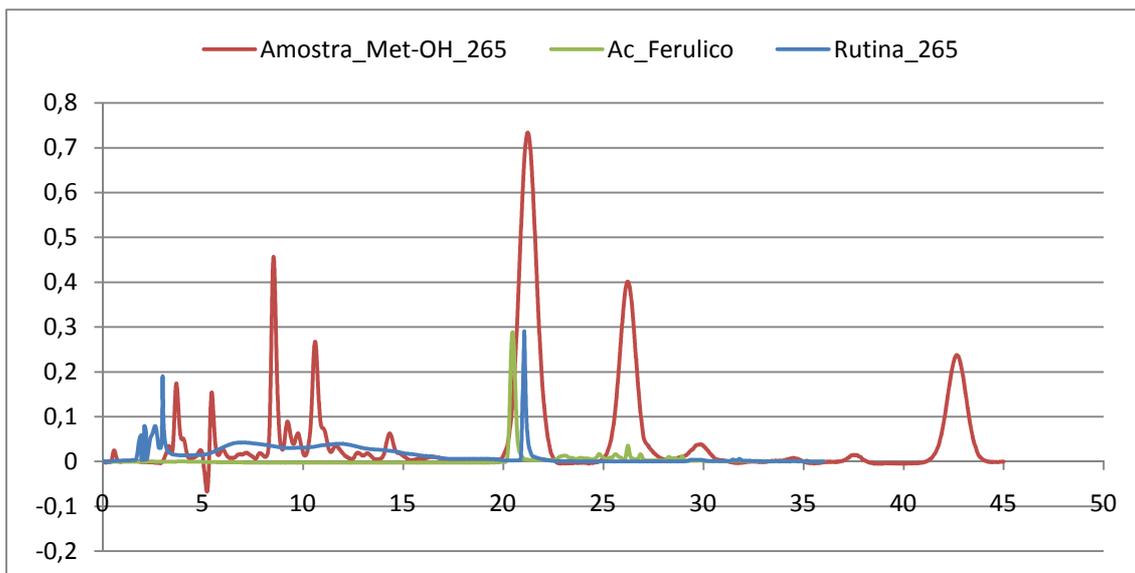


Figura V: Cromatograma comparativo para identificação e seletividade entre os compostos rutina e ácido ferúlico em $\lambda = 265$ nm

As figuras VI e VII mostram os cromatogramas comparando os tempos de retenção nos comprimentos de onda de 325 e 265 nm.

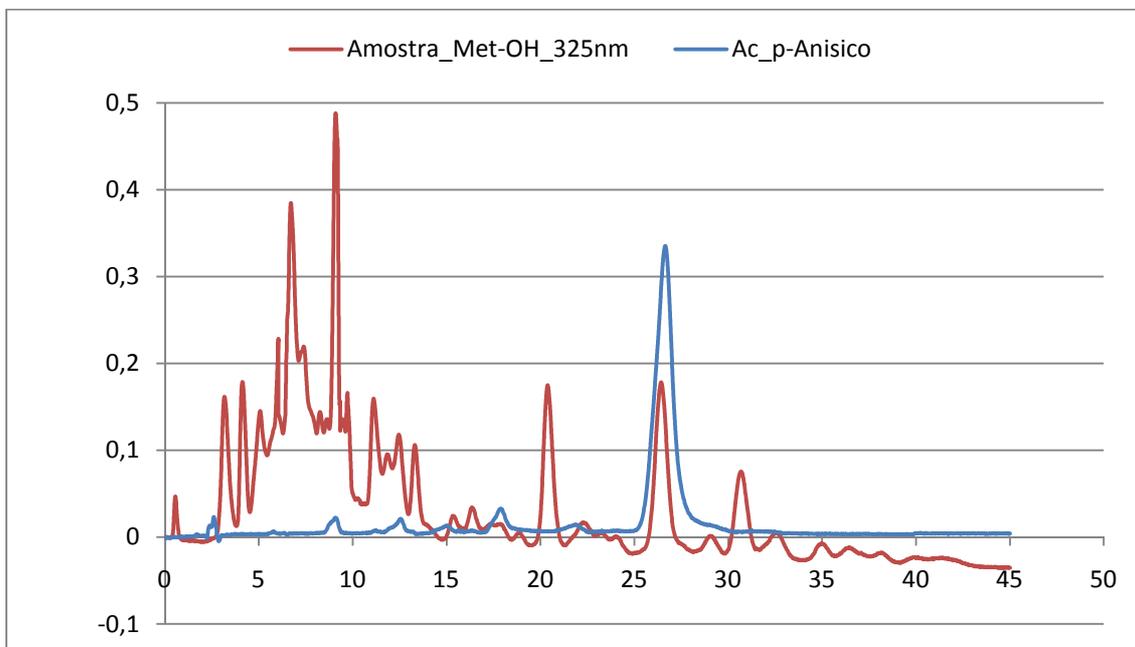


Figura VI: Cromatograma comparativo para identificação do ácido p-anísico através de padrão em $\lambda = 325$ nm

Para identificação e quantificação do composto ácido p-anísico comparou-se os tempos de retenção do padrão e da amostra, variando-se o comprimento de onda para confirmar sua presença na amostra. Mais uma vez foi possível identificar o composto pela coincidência dos tempos de retenção com o padrão na comparação com a amostra, assim como a variação do tamanho do pico no comprimento de onda de 265 nm, onde o composto possui maior absorbância.

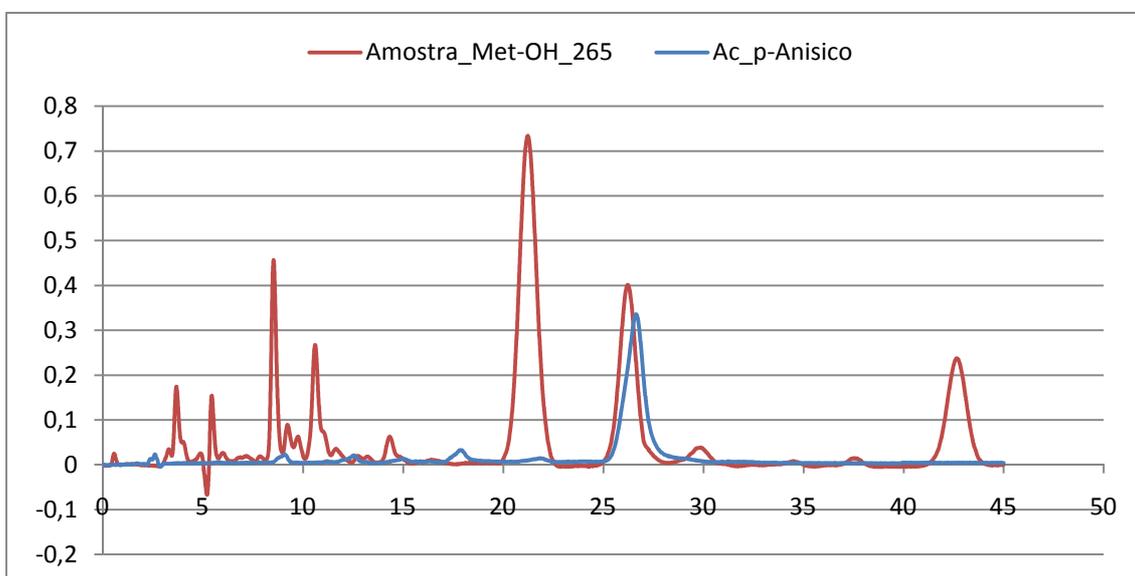


Figura VII: Cromatograma comparativo para identificação do ácido p-anísico através de padrão em $\lambda = 265$ nm

As Figuras VIII e IX mostram os perfis cromatográficos comparando as amostras aquosas aos padrões dos compostos ácido clorogênico e naringina nos comprimentos de onda 340 e 290 nm.

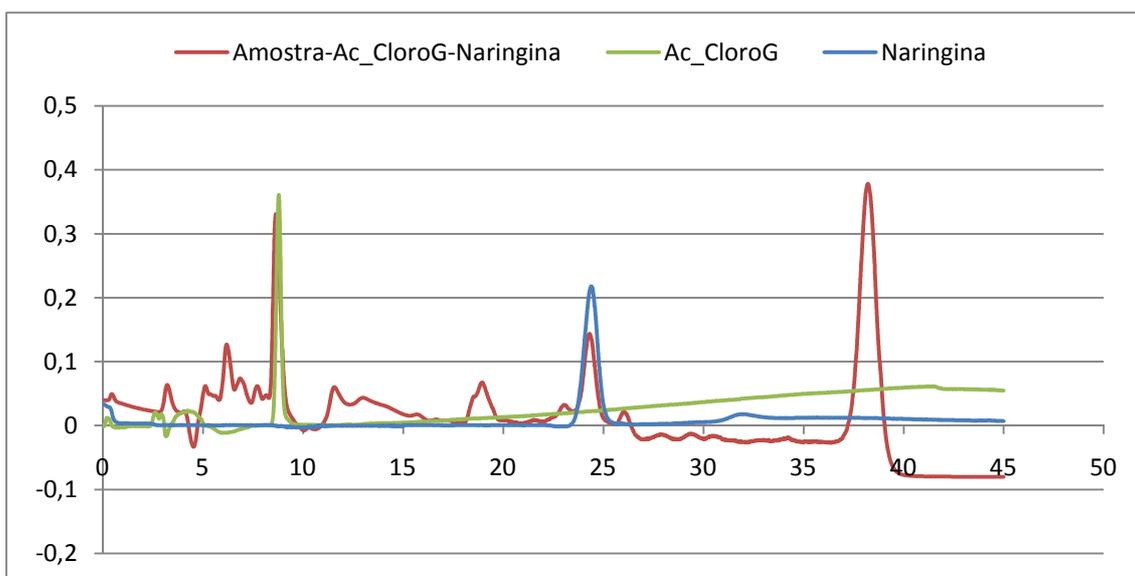


Figura VIII: Cromatograma comparativo para identificação dos compostos ácido clorogênico e naringina na amostra através de padrão em $\lambda = 340$ nm

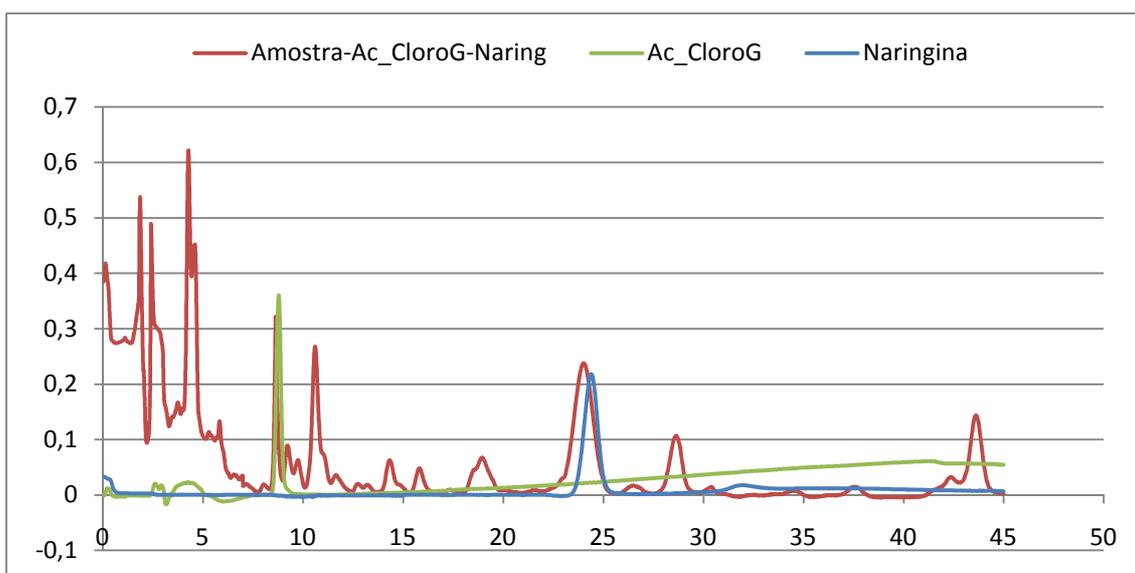


Figura IX: Cromatograma comparativo para identificação dos compostos ácido clorogênico e naringina na amostra através de padrão em $\lambda = 290$ nm

Nestes casos, a identificação dos compostos não foi dificultada, os tempos de retenção na amostra foram compatíveis com os tempos dos padrões dos compostos que se buscava, assim como a variação do tamanho dos picos nos diferentes comprimentos de onda, que confirmaram as identidades dos compostos.

A análise quantitativa dos compostos foi feita utilizando método de padrão externo. Foram construídas curvas analíticas para os compostos encontrados nas amostras através dos cromatogramas relativos aos padrões nas concentrações (0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 25,0 mg L⁻¹). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

As Figuras X a XIII trazem os gráficos (área x concentração) representando as curvas analíticas para os compostos ácido p-anísico ($\lambda=265\text{nm}$), ácido clorogênico ($\lambda=325\text{nm}$) e naringina e rutina ($\lambda=290\text{nm}$).

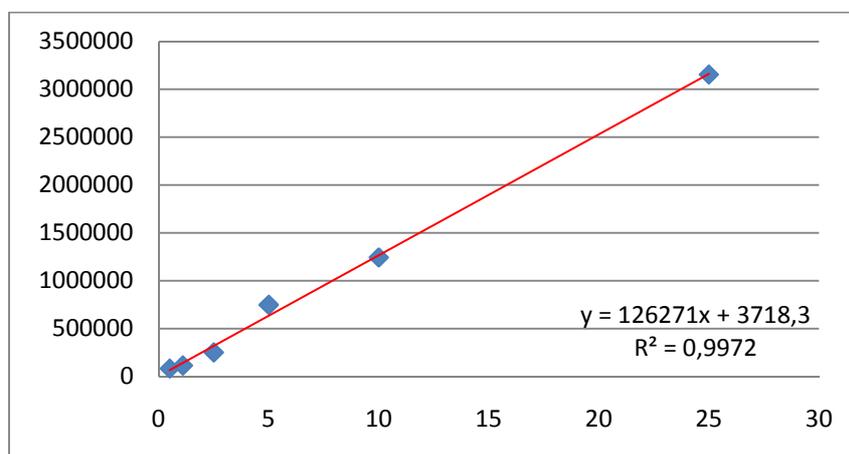


Figura X: Gráfico representando a curva analítica do composto rutina

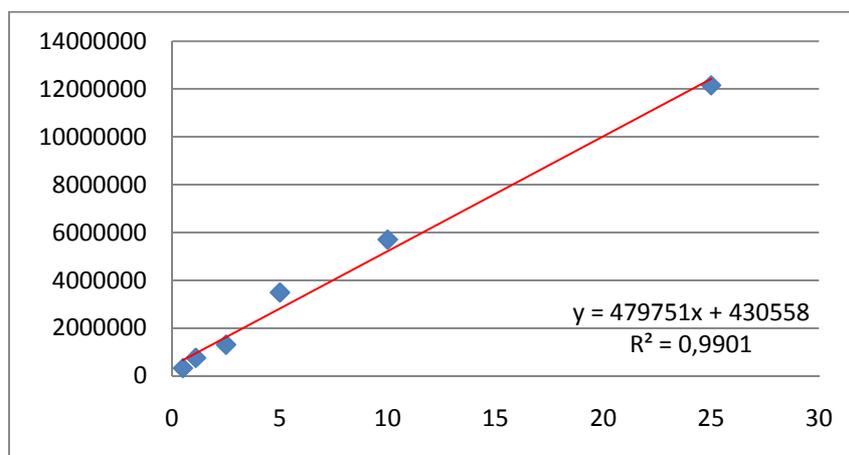


Figura XI: Gráfico representando a curva analítica do composto ácido p-Anísico

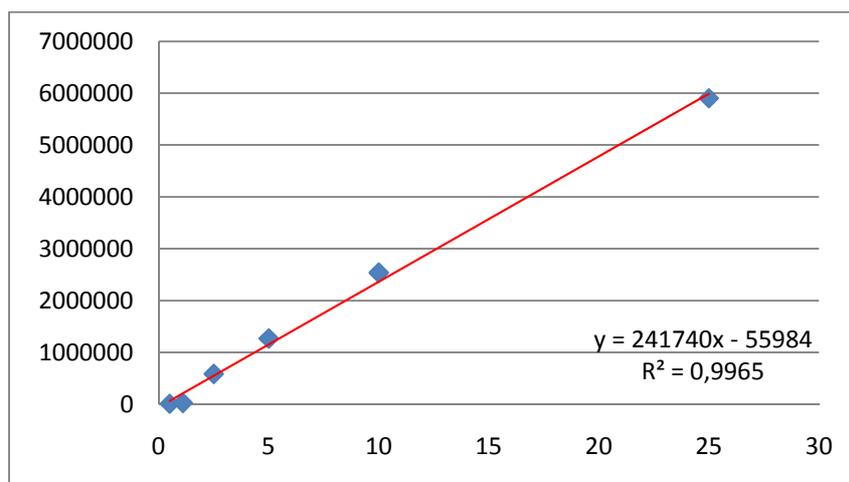


Figura XII: Gráfico representando a curva analítica do composto ácido clorogênico

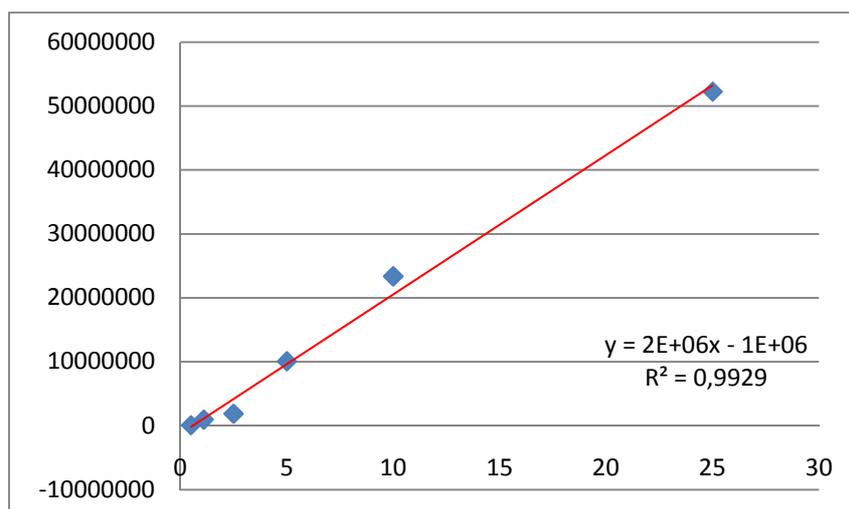


Figura XIII: Gráfico representando a curva analítica do composto naringina

As curvas analíticas apresentam linearidade com relação à resposta do detector no intervalo de concentração, com os coeficientes de correlação (R^2) superiores a 0,9900.

A análise dos cromatogramas gerados pelas amostras e a comparação dos tempos de retenção dos padrões nos diferentes comprimentos de onda permitiu a identificação de 4 compostos presentes nas amostras de folhas de feijão-de-porco, e através das concentrações dos padrões utilizados e a

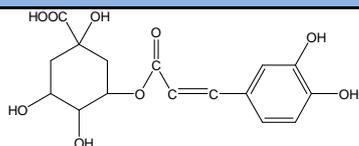
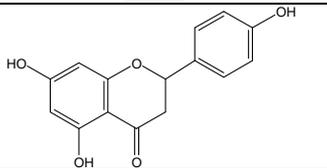
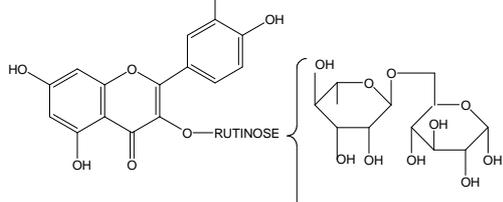
comparação feita entre as áreas dos picos, foi possível também calcular a possível concentração do composto na amostra. A Tabela XXIV traz a relação dos compostos identificados na amostra juntamente com seus respectivos tempos de retenção, comprimentos de onda de absorção e concentração calculadas.

Tabela XXIII: Compostos identificados com seus respectivos tempos de retenção e comprimento de onda que absorvem na região do UV-Vis

Composto	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda no UV-Vis (nm)	Concentrações	
			Na amostra (mg L ⁻¹)	Na planta (mg kg ⁻¹)
Ácido Clorogênico	9,15	340	4,42	88,41
Ácido p-anísico	26,60	250	6,00	120,00
Naringina	25,20	290	3,75	75,00
Rutina	21,05	265	5,00	100,00

A Tabela XXV apresenta os valores para os limites de detecção e quantificação calculados segundo IUPAC (LONG, 1983)⁵⁸.

Tabela XXIV: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os compostos determinados

Composto	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Estrutura molecular
Ácido Clorogênico	0,0154	0,0513	
Ácido p-anísico	0,0125	0,0418	
Naringina	0,0642	0,2140	
Rutina	0,0212	0,0706	

Estudos anteriores realizados com a espécie *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) demonstraram o potencial de seus componentes no controle de espécies de plantas daninhas, como trapoeraba e corda-de-viola, que trazem grandes prejuízos a culturas importantes como soja e cana-de-açúcar.

Este trabalho vem complementar aqueles estudos com resultados animadores, que podem levar a efetiva utilização de compostos retirados de plantas no combate a plantas daninhas, na tentativa de favorecer uma agricultura menos carregada de compostos agressivos ao ambiente. Os testes de seletividade utilizando extratos de diferentes concentrações preparados a partir das folhas e sementes de feijão-de-porco, confirmaram o potencial bioerbicida dos compostos presentes nessas partes da planta. Os testes de toxicidade para os extratos definiram que os tratamentos preparados a partir da semente são os melhores para o controle efetivo das plantas daninhas de estudo, trapoeraba e corda-de-viola.

As concentrações 20 e 50 g L⁻¹ foram as mais eficientes no uso como bioerbicida, conseguiram interromper totalmente o desenvolvimento das invasoras nos períodos de aplicação escolhidos, de forma que não houve qualquer chance de recuperação para as plantas. Dados obtidos após aplicação dos tratamentos revelam que a redução da biomassa das plantas chegou a 87,97% e 91,56% para as respectivas concentrações. Os efeitos sobre as plantas são rápidos, aparecendo em 36 horas, e são devastadores, iniciando pela destruição das folhas, que secam e murcham, e após 72 horas os efeitos são visíveis em toda a planta, que para de crescer e inicia o processo de definhamento, secando e murchando inteiramente. A aplicação de

um volume de 3,5 mL em uma planta que se desenvolve por até 30 dias após a germinação de sua semente, é suficiente para controle total da espécie em até 5 dias utilizando essas concentrações. Os demais tratamentos com concentrações menores apresentaram níveis de controle variados, causando danos leves ou moderados, prejudicando o desenvolvimento efetivo das plantas, mas permitindo sua recuperação parcial ou total. Estes tratamentos podem ser utilizados para um controle específico, como inibição de crescimento ou desenvolvimento da planta daninha, ou outra finalidade menos drástica que a morte.

Foi testada também a seletividade dos tratamentos 25 e 50 g L⁻¹, aplicando os mesmos sobre parcelas constituídas pelas plantas daninhas em estudo e por cultivares de soja transgênica e convencional. Os tratamentos apresentaram os resultados normais de controle sobre as plantas daninhas, porém não afetaram visivelmente os cultivares de soja, tanto transgênico quanto convencional, que se desenvolveram normalmente durante o período de observação que foi até 15 dias após a morte das plantas daninhas. De alguma forma, pelo fato de a soja ser também uma leguminosa, não é aparentemente afetada pelos compostos presentes nos tratamentos. Isto, no entanto, não significa que os tratamentos sejam seletivos à cultura, pois testes de produtividade devem ser realizados posteriormente para a confirmação desta hipótese.

5. Conclusões

Diante do quadro que se apresenta na atualidade em relação à agricultura e as necessidades de se obter uma produção sempre representada por quantidade e qualidade, é inegável o benefício obtido com a utilização de herbicidas no controle de plantas daninhas, assim como são muito fáceis de se notar os problemas relativos ao uso dos mesmos.

É de grande interesse que se consigam produtos menos agressivos ao ambiente, e nessa linha de pensamento os compostos obtidos da própria natureza ganham cada vez mais espaço nas pesquisas, na esperança de que possam contribuir com essas características. De encontro a essa tendência, este trabalho traz resultados interessantes no que diz respeito à utilização de compostos naturais com efeitos eficazes no controle de plantas daninhas.

Os extratos preparados de folhas e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) demonstraram eficiência no controle das plantas daninhas utilizadas no trabalho, trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*), podendo assim ser utilizados como bioherbicidas pós-emergentes. Sendo as duas plantas dicotiledôneas de folha larga, é possível que espécies com essas características possam também ser controladas ou sofrer os mesmos efeitos sob ação do tratamento, observando-se as variáveis volume e modo de aplicação.

As concentrações 25 e 50 g L⁻¹ preparadas de sementes de feijão-de-porco foram as únicas que apresentaram controle total sobre as plantas daninhas estudadas, a ação dos extratos é rápida e eficiente, em menos de 48 horas os efeitos começam a aparecer e em uma semana o desenvolvimento

das plantas daninhas é totalmente interrompido, sem chance de qualquer tipo recuperação. As demais concentrações podem ser utilizadas de acordo com a necessidade, para um controle parcial sobre invasoras em culturas.

A seletividade dos extratos com relação a cultivares de soja foi também testada apresentando resultado promissor. As amostras de soja transgênica e convencional não foram afetadas pelos extratos, demonstrando aparente imunidade a sua ação. Apesar de a soja ser uma dicotiledônea de folha larga como as plantas daninhas, ela pertence a mesma família (Fabaceae) do feijão-de-porco, podendo ser esta a razão pela qual a mesma não sofre os efeitos do extrato, o que deve ser devidamente comprovado através de testes de produtividade da cultura. Nas folhas foram detectados e identificados com sucesso os compostos fenólicos ácido clorogênico, ácido p-anísico, naringina e rutina, determinados via HPLC.

O preparo destes extratos é muito simples e fácil, no entanto há que se fazer um estudo sobre custos, já que não é necessária utilização de equipamentos sofisticados ou caros, e a água não carece de elevada purificação, mantendo os efeitos e a eficiência no controle das plantas daninhas. O aprimoramento do preparo pode levar à definição de uma mistura ótima de água e semente, que determinará a concentração desejada, evitando a etapa de retirada de água em rotaevaporador, colaborando também para baixar o custo de preparo.

Deve-se realizar a aplicação de campo destes extratos, avaliando sua ação sobre plantas daninhas com mais de 30 dias após a germinação de sua semente, assim como avaliar a produtividade de uma cultura sob ação dos extratos, para confirmar sua seletividade.

6. Referências Bibliográficas

1 – DIAMOND, J. **Armas, germes e aço: os destinos das sociedades humanas.** Rio de Janeiro: Record, 2009. 476 p.

2 – BRAUDEL, F. **Civilização material, economia e capitalismo: séculos XV-XVIII.** 3 v. São Paulo: Martins Fontes, 2005. 536 p.

3 – STANDAGE, T. **Uma História Comestível Da Humanidade.** Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2010. 276 p.

4 – BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Embrapa; cultivo do milho; plantas daninhas; set/2007. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/plantasdaninhas.htm>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

5 – SOUZA, F.C.S. Repensando a agricultura: O enfoque da sustentabilidade como padrão alternativo à agricultura moderna. **HOLOS**, v. 20, p. 1-14, 2004.

6 – HAWKEN, P.; LOVINS, A.; LOVINS, L. H. **Capitalismo Natural: criando a próxima revolução industrial.** São Paulo: Cultrix, 1999. 358 p.

7 – BRAVO, S.O.; RODRÍGUEZ-ITHURRALDE, D. Posdata, pesticidas, salud y ambiente. Disponível em: <<http://iibce.edu.uy/posdata/index.htm>>. Acesso em: 07 abr. 2009.

8 – CARSON, R. **Primavera Silenciosa.** São Paulo: Melhoramentos, 1962. 305 p.

9 – HAYES, W.J., LAWS, E.R. **Handbook of pesticides toxicology: general principles.** San Diego: Academic Press, 1991. p. 21-65.

10 – BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 12 ago. 2008.

11 – CHRISTOFFOLETI,P.J.; OVEJERO,R.F.L.; CARVALHO,J.C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Campinas: Associação brasileira de ação a resistencia de plantas aos herbicidas, 2004. 100 p.

12 – CHRISTOFFOLETI,P.J.; VICTORIA FILHO,R.; SILVA,C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

13 – INTERNATIONAL survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

14 – VIDAL,R.A.; MEROTTO,A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p.138-148.

15 – CÓDIGO Internacional de Conduta para a Distribuição e Utilização de Pesticidas. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Roma, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Default.htm>>. Acesso em: 17 out. 2009.

16 – JUSBRASIL. Diário Oficial da União, Seção 1, página 9, anexo XIII. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/482915/dou-secao-1-10-02-2009-pg-9>>. Acesso em: 16 jan. 2010.

17 – INTERNATIONAL Plant Protection Convention. Core Activities. Standards Setting. Adopted Standards. Disponível em: <[https://www.ippc.int/index.php?id=13399&tx_publication_pi1\[showUId\]=184195&frompage=13399&type=publicatio&n&subtype=&L=0#item](https://www.ippc.int/index.php?id=13399&tx_publication_pi1[showUId]=184195&frompage=13399&type=publicatio&n&subtype=&L=0#item)>. Acesso em: 22 jan. 2010.

18 – LORENZI,H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa: Plantarum, 1991. 440p.

19 – KISSMANN,K.G. Herbicidas: passado, presente e futuro. In: VARGAS, L; ROMAN, E. S. (Ed.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 11-12.

20 – VELASCO,L.O.M.; CAPANEMA,L.X.L. **O setor de agroquímicos**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2006. p. 69-96.

- 21 – BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em <<http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/LEIS/L7802.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- 22 – BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Legislação. SISLEGIS. Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2002. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16764>>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- 23 – OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, v. 3, n. 1, 2008. p 1-7.
- 24 – LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v. 2, n. 15, p. 162-166, 1992
- 25 – ANAYA, L.A. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. **Critical Review in Plant Science**, v.18, n.6, p.697-739, 1999.
- 26 – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Água – teste de toxicidade aguda com peixes: parte I sistema estático. In: MÉTODOS de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo: CETESP, 1999. 1 v.
- 27 – HAYES JUNIOR, W.J.; LAWS JUNIOR, E.R. **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego: Academic Press, 1991. 1576 p.
- 28 – KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides chemistry degradation and mode of action**. New York: Marcel Dekker, 1976. 421 p.
- 29 – FERREIRA, F. A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. Mecanismos de ação de herbicidas. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf>. Acesso em: 07 mai. 2008.

- 30 – BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Embrapa Cerrados. Herbicidas: Mecanismos de ação e uso. Outubro 2008. Disponível em
<<http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=8&ved=0CFAQFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.cpac.embrapa.br%2Fdownload%2F1264%2Ft&rct=j&q=classifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20herbicidas&ei=A5H-TPKfNMO78gbiiKGdBw&usq=AFQjCNFW3M9VMuRgEA-N10iV0k9L9f6IKQ>>.
Acesso em: 15 mar. 2010.
- 31 – VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. **Herbicidas**: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Palotti, 1997. 165p.
- 32 – PLANTAS exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. **Revista Ciência Hoje**, n. 178, p. 42-44. 2001.
- 33 – PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- 34 – LUCKNER, M. **Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals**. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1990. 316 p.
- 35 – BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 259-267, 1996.
- 36 – BLUM, U., SHAFER, S.R., LEHMAN, M.E. Evidence of inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils. **Critical Review in Plant Science**, v.18, p. 673-693, 1999.
- 37 – VYVYAN, R. J. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.
- 38 – HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1993. 318 p.
- 39 – DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-449, 1999.
- 40 – ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. **Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

- 41 – DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.
- 42 – ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. p. 341-399. Boletim Circular do Instituto Agrônomo do Paraná 53.
- 43 – MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.
- 44 – SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 357-364, 2002b.
- 45 – BISBY, F. A.; BUCKINGHAN, J.; HARBONE, J. B. **Phytochemical dictionary of the leguminosae**. Plants and their constituents. Cambridge: Chapman & Hall, 1994. v. 1.
- 46 – BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Embrapa: Comunicado Técnico, 96. A Importância do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC.) como cultura intercalar em rotação com milho e feijão caupi em cultivo de coqueirais no Município de Ponta-de-Pedras/Marajó-PA. Brasília: MAPA, 2004. 1 v.
- 47 – CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974. v. 5, 687 p.
- 48 – SANTOS, Sonia. **Potencial Alopático e Avaliação Sistemática de Compostos Secundários em Extratos Provenientes de *Canavalia ensiformis* Utilizando eletroforese Capilar**. 2004. 185 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- 49 – UDEDIBIE, A. B. I.; CARLINI, C. R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds—A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, p. 95-106, 1998.
- 50 – SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; SOUZA FILHO, A. P. S.; REZENDE, M.O.O.; **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, B40, n.1, p.77-84, 2005.

51 – MENDONÇA, Raquel. Lourenço de. **Determinação de aleloquímicos por HPLC/UV-Vis em extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformes* e estudo da atividade alelopática.** 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

52 – Sociedade Portuguesa de Química. Boletim Informativo N° 100. **Mikhail S. Tswett:** Um legado para a cromatografia moderna. Jan/2006. Disponível em <http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_100_051_28.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2009.

53 - CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho:** HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 179 p.

54 – SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Cengage Learning, 2008. p 80-96.

55 – AQUINO NETO, F. R.; SOUZA NUNES, D. S. **Cromatografia:** princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 188 p.

56 - SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS - SBPCPD. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas.** Londrina: SBPCPD, 1995. 42 p.

57 – CHIOVATO, Marcel Godói. **Controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar com herbicidas aplicados na época seca.** 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

58 – LONG, L.G.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection: A closer at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p.712a – 724a. 1983