

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Adiantum tetraphyllum* HUMB. & BONPL. EX. WILLD (PTERIDACEAE)****Jorge L. R. Melos**

Seção de Ensino "C", Colégio Militar de Campo Grande, Av Pres. Vargas, 2800, 79115-810 Campo Grande – MS, Brasil

**Luciana B. Silva, Marize T. L. P. Peres, Ana M. Mapeli, Odival Faccenda, Hátino H. Anjos, Thais G. Torres, Soraia C. Tivoli, Ana L. Batista, Felipe G. N. Almeida, Natasha S. Flauzino, Letícia A. Tibana e Sônia C. Hess\***

Departamento de Hidráulica e Transportes, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

**Neli K. Honda**

Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande – MS, Brasil

Recebido em 17/10/05; aceito em 14/6/06; publicado na web em 28/11/06

CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ALLELOPATHIC POTENTIALS OF *Adiantum tetraphyllum* HUMB. & BONPL. EX. WILLD (PTERIDACEAE). Chemical studies of green leaves of *A. tetraphyllum* afforded  $\beta$ -sitosterol, a mixture containing the ethyl esters of long chain carboxylic acids, 30-normethyl-lupan-20-one, hopan-22-ol, phytol, phyten-3(20)-1,2-diol, quercetin and quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside. The structures of the compounds were elucidated by spectroscopic and GC analysis. The allelopathic potentials of the crude ethanolic extract and fractions were evaluated against *Lactuca sativa* (letuce) and *Allium cepa* (onion) seeds.

Keywords: *Adiantum tetraphyllum*; fern; allelochemicals.

**INTRODUÇÃO**

Aproximadamente nove mil espécies de pteridófitas já foram descritas na literatura, sendo que 75% delas ocorrem nas regiões úmidas tropicais e subtropicais<sup>1</sup>. A família Pteridaceae apresenta distribuição cosmopolita, com 35 gêneros, sendo que destes, 22 ocorrem nas Américas<sup>2</sup>. O gênero *Adiantum* (Pteridaceae), com 150 espécies, é um gênero de samambaias largamente distribuído pelo planeta, sendo que muitas das espécies de *Adiantum* estão confinadas à América tropical<sup>1</sup>.

As pteridófitas exibem um forte mecanismo de dominância nas áreas onde crescem, formando associações quase puras, onde apenas poucas espécies coexistem. Este mecanismo de dominância estende-se desde os trópicos até as margens de florestas boreais<sup>3</sup>. Espécies de samambaias da família Pteridaceae, tais como *Pteridium aquilinum*<sup>4</sup>, *Adiantopsis radiata*, *Adiantum serratodentatum*, *Pteris denticulata*, *Pityrogramma calomelanos*<sup>5</sup> e de Gleicheniaceae, como *Gleichenia pectinata*<sup>6</sup> e *Gleichenia japonica*<sup>7</sup>, apresentaram destacada atividade alelopática em bioensaios, contendo fitotoxinas solúveis capazes de influenciar na germinação e no crescimento de espécies-alvo.

Diversas espécies de *Adiantum*, tais como *A. capillus-veneris*, *A. cuneatum*, *A. caudatum*, *A. humulatum*, *A. monochlamys*, *A. pedatum* e *A. venustum* têm sido empregadas pela medicina tradicional como agentes antibacterianos, antipiréticos, diuréticos, antiinflamatórios, antivirais, antitumorais e contra bronquite, doenças de pele e diabetes<sup>8</sup>.

*Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae) é uma samambaia que habita regiões sombrias e úmidas em Mato Grosso do Sul. A avaliação do potencial alelopático do extrato etanólico bruto das frondes verdes de *A. tetraphyllum* demonstrou que este não interfere significativamente na germinação de alface e cebola e inibe o desenvolvimento, tanto da radícula quanto do hipocótilo das plântulas de alface. Porém, não interfere significativamente na ger-

minação e crescimento do coleótilo da cebola<sup>5</sup>. As atividades alelopáticas relevantes apresentadas serviram de estímulo para a realização dos estudos químicos e biológicos com *A. tetraphyllum*, apresentados no presente trabalho. Não foram encontrados, na literatura, relatos de estudos químicos realizados com *A. tetraphyllum*.

**PARTE EXPERIMENTAL****Instrumentação e material cromatográfico**

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-300. As amostras foram solubilizadas em CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD e foi tomado como padrão interno de referência o TMS. Os experimentos no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR-Bomem – modelo M-100, e os materiais dispostos em pastilhas de KBr. As análises cromatográficas a gás foram realizadas em equipamento Varian modelo CP 3800 com coluna capilar de sílica fundida de fase ligante, modelo Carbowax (Quadrex), com 30 m de comprimento, diâmetro de 0,25 mm e espessura da fase de 0,25  $\mu$ m, utilizando-se hélio como gás de arraste, temperatura do injetor, 220 °C, temperatura do detector, 240 °C, fluxo inicial de 1 mL/min, pressão constante no topo da coluna de 41,2 psi, programação da temperatura: isoterma 180 °C por 20 °C/min, com rampa de 2 °C/min até 220 °C por 5 min, com tempo total de 45 min, volume injetado de 1  $\mu$ L. Nas colunas cromatográficas foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh) da marca Vetec.

**Material vegetal**

As frondes verdes de *Adiantum tetraphyllum* foram coletadas em 3/9/2003, na fazenda Cabeceira do Dourado, no município de Antônio João, em Mato Grosso do Sul. Os materiais vegetais foram identificados pelos botânicos L. P. Clemente (UFMS) e A. Salino (UFMG) e uma exsiccata da espécie foi incorporada ao acervo do Herbário da UFMS, Campo Grande, MS, sob o número *Adiantum tetraphyllum* Willd., MS: Antônio João, Faz. Cabeceira

\*e-mail: schess@nin.ufms.br

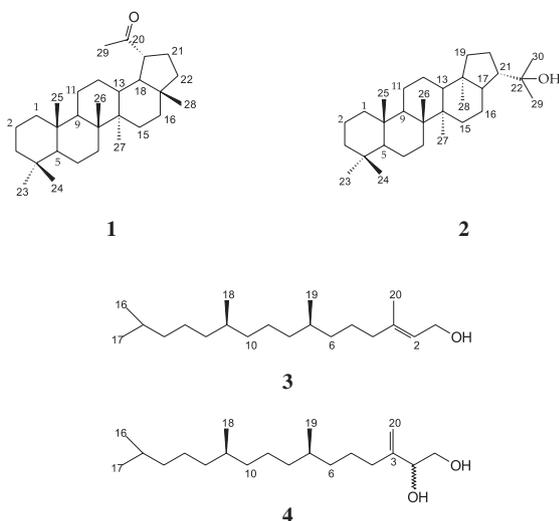
do Dourado, Clemente, L.P., Sciamarelli, A. & Carneiro, I.A. 72 (CGMS/BHCB).

### Extração e isolamento dos compostos

As frondes verdes foram trituradas manualmente (586,0 g, 33,8% umidade) e submetidas à extração exaustiva com EtOH, à temperatura ambiente, por 10 dias, ao abrigo da luz. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, resultando no extrato etanólico bruto (15,9 g), que foi solubilizado (13,9 g) em mistura H<sub>2</sub>O/EtOH 9:1 e, em funil de separação, exaustivamente particionado com hexano, rendendo a fração hexânica (5,2 g). A fração hidroalcoólica resultante foi novamente particionada exaustivamente com AcOEt, rendendo a fração em AcOEt (3,2 g) e em H<sub>2</sub>O/EtOH (5,0 g). Parte da fração hexânica (3,1 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 [(0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM)] eluída com gradiente de solventes hexano/AcOEt/EtOH de polaridade crescente, coletando-se frações de 50 mL. A fração 57-62 (hexano/AcOEt 95/5) (476,7 mg) foi novamente submetida à cromatografia em coluna, coletando-se frações de 7 mL. A segunda coluna cromatográfica rendeu a fração 128-167 (hexano/AcOEt 90/10) (278,5 mg), contendo materiais que, após avaliação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, foram identificados como misturas de ésteres etílicos de ácidos graxos. Os componentes da mistura de ésteres foram, então, submetidos à transesterificação com MeOH, de acordo com procedimento descrito na literatura<sup>9</sup> e, após análises por co-injeção com padrões em um cromatógrafo a gás, foram identificados como contendo os ésteres metílicos do ácido palmítico (16:0) (59,2%), petroselinico, oléico e (*Z*)-vacênico (18:1) (15,7%), esteárico (18:0) (5,0%), linoléico (18:2) (3,5%), decosaenóico (22:6) (2,7%),  $\alpha$ -linolênico (18:3) (0,7%), margárico (17:0) (0,9%), araquídico (20:0) (0,8%) e beênico (22:0) (0,4%). A mesma coluna cromatográfica secundária também rendeu a fração 168-173 (hexano/AcOEt 88/12) (20,5 mg), contendo a 30-normetil-lupan-20-ona (**1**).

A fração 79-100 (hexano/AcOEt 92/8) (51,7 mg), da primeira coluna cromatográfica, também foi submetida à cromatografia em coluna, coletando-se frações de 7 mL, rendendo a fração 63-81 (hexano/AcOEt 94/6) (5,6 mg), contendo o triterpenóide pentacíclico hopan-22-ol (**2**).

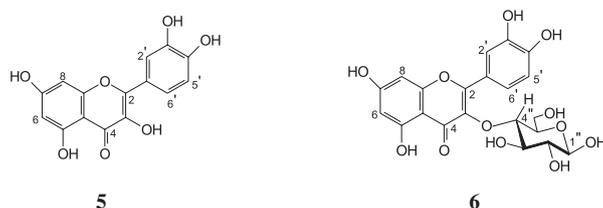
A fração 101-124 (hexano/AcOEt 90/10 e 87/13) (169,3 mg) da primeira coluna cromatográfica foi purificada em coluna de sílica, coletando-se frações de 7 mL, obtendo-se na fração 142-175 (hexano/AcOEt 88/12) (33,1 mg), um óleo identificado como sendo o diterpenóide fitol (**3**), e na fração 249-270 (hexano/AcOEt 70/30) (11,7 mg), outro óleo identificado como sendo o fiten-3(20)-1,2-diol (**4**).



A fração 141-155 (hexano/AcOEt 85/15 e 83/17) (161,2 mg) da primeira coluna cromatográfica também foi purificada em coluna cromatográfica, rendendo na fração 95-119 (hexano/AcOEt 88/12 e 86/14) (38,2 mg), um sólido branco identificado por análises de CG, IV, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN, por comparação com padrão disponível no laboratório e dados da literatura<sup>10</sup>, como sendo o  $\beta$ -sitosterol.

Parte da fração em AcOEt (780,3 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 [(0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM)] eluída com gradiente de solventes hexano/AcOEt/EtOH de polaridade crescente, coletando-se frações de 50 mL. A fração 25-29 (75,9 mg) (hexano/AcOEt 50/50) foi submetida a novo processamento em coluna cromatográfica, coletando-se frações de 7 mL, rendendo na fração 8-11 (hexano/AcOEt 50/50) (18,3 mg) um sólido branco identificado por análises de IV e <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN, e por comparação com dados da literatura<sup>11</sup>, como contendo uma mistura dos ácidos ferúlico e cafeico com p-hidroxibenzaldeído.

A fração 84-87 (46,1 mg) da primeira coluna cromatográfica da fração AcOEt (AcOEt/EtOH 50/50) continha um sólido amarelo identificado como sendo a quercetina (**5**), enquanto a fração 95-118 (EtOH) (101,3 mg) da primeira coluna cromatográfica da mesma fração AcOEt foi recromatografada, rendendo na fração 67-74 (EtOH/H<sub>2</sub>O 90/10) (15,2 mg), um sólido amarelo identificado como quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (**6**).



**30-Normetil-lupan-20-ona (1)**. Sólido branco, p.f. 212-214 °C. IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2926, 2856, 1704, 1464, 1376. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.; *J* em Hz; int.): 2,22 (H-21; *mult.*; 2H); 0,813 (H-23, *s*; 3H); 0,781 (H-24, *s*; 3H); 0,931 (H-25, *s*; 3H); 0,758 (H-26, *s*; 3H); 0,546 (H-27, *s*; 3H); 0,901 (H-28, *s*; 3H); 2,08 (H-29; *s*; 3H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 41,2 (C-1), 24,0 (C-2), 42,0 (C-3), 33,3 (C-4), 56,0 (C-5), 18,6 (C-6), 33,3 (C-7), 41,8 (C-8), 50,2 (C-9), 37,3 (C-10), 20,8 (C-11), 22,1 (C-12), 48,9 (C-13), 44,7 (C-14), 41,2 (C-15), 33,2 (C-16), 41,8 (C-17), 53,9 (C-18), 53,6 (C-19), 210,8 (C-20), 22,9 (C-21), 40,2 (C-22), 33,3 (C-23), 21,5 (C-24), 16,5 (C-25), 15,8 (C-26), 14,5 (C-27), 16,6 (C-28), 30,8 (C-29). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>12</sup>.

**Hopan-22-ol (2)**. Sólido branco; IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3438, 2924, 2856. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.; *J* em Hz; int.): 2,15 (H-21; *mult.*; 1H); 0,853 (H-23, *s*; 3H); 0,788 (H-24, *s*; 3H); 0,820 (H-25, *s*; 3H); 0,931 (H-26 e H-27, *s*; 6H); 0,766 (H-28, *s*; 3H); 1,18 (H-29, *s*; 3H); 1,20 (H-30, *s*; 3H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 40,2 (C-1), 18,6 (C-2), 42,0 (C-3), 33,2 (C-4), 56,0 (C-5), 18,6 (C-6), 33,2 (C-7), 41,8 (C-8), 50,3 (C-9), 37,3 (C-10), 20,8 (C-11), 24,1 (C-12), 49,8 (C-13), 41,8 (C-14), 34,3 (C-15), 21,9 (C-16), 53,8 (C-17), 44,0 (C-18), 41,2 (C-19), 26,5 (C-20), 51,1 (C-21), 73,9 (C-22), 33,3 (C-23), 21,5 (C-24), 15,8 (C-25), 16,7 (C-26), 17,0 (C-27), 16,1 (C-28), 28,7 (C-29), 30,8 (C-30). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>13</sup>.

**Fitol (3)**. Óleo. IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3390, 2953, 2925, 2868. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.; *J* em Hz; int.): 4,12 (H-1; *d*; 6,7; 2H); 5,36 (H-2; *t*; 6,7; 1H); 1,94 (H-4; *t*; 7,5; 2H); 1,64 (H-20; *s*; 3H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 59,4 (C-1), 123,1 (C-2), 140,1 (C-3), 39,8 (C-4), 25,1 (C-5), 36,6 (C-6),

32,7 (C-7), 37,2 (C-8), 24,5 (C-9), 37,3 (C-10), 32,6 (C-11), 37,3 (C-12), 24,7 (C-13), 39,3 (C-14), 27,9 (C-15), 22,7 (C-16), 22,6 (C-17), 19,7 (C-18), 19,7 (C-19), 16,1 (C-20). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>14</sup>. Também foram possíveis comparações por cromatografia, com padrão do fitol disponível no laboratório.

**Fiten-3(20)-1,2-diol (4).** Óleo. IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3417, 2953, 2926, 1651. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.;  $J$  em Hz; int.): 3,71 (H-1; mult.; 2H); 4,18 (H-2;  $dd$ ; 6,7 e 4,3; 1H); 1,99 (H-4; mult.; 2H); 5,11 (H-20a;  $s$ ; 1H); 4,95 (H-20b;  $s$ ; 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 65,8 (C-1), 75,0 (C-2), 148,6 (C-3), 32,9 (C-4), 25,5 (C-5), 36,8 (C-6), 32,7 (C-7), 37,4 (C-8), 24,4 (C-9), 37,4 (C-10), 32,7 (C-11), 37,3 (C-12), 24,8 (C-13), 39,3 (C-14), 27,9 (C-15), 22,6 (C-16), 22,7 (C-17), 19,7 (C-18), 19,7 (C-19), 110,5 (C-20). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>15</sup>.

**Quercetina (5).** Sólido amarelo, p.f. 312-314 °C. IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3410, 1663, 1612. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.;  $J$  em Hz; int.): 7,68 (H-2';  $d$ ; 1,9; 1H); 6,63 (H-5';  $d$ ; 8,5; 1H); 6,13 (H-6;  $d$ ; 1,8; 1H); 7,58 (H-6';  $dd$ ; 8,5 e 1,9; 1H); 6,38 (H-8;  $d$ ; 1,8; 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 148,0 (C-2), 137,0 (C-3), 177,3 (C-4), 162,4 (C-5), 99,2 (C-6), 165,5 (C-7), 94,4 (C-8), 158,1 (C-9), 104,4 (C-10), 124,1 (C-1'), 115,9 (C-2'), 146,1 (C-3'), 148,7 (C-4'), 116,2 (C-5'), 121,6 (C-6'). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>16</sup>. Também foi possível a comparação dos dados espectrais com aqueles obtidos para o padrão de quercetina disponível no laboratório.

**Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (6).** Sólido amarelo. IV (pastilha KBr),  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3242, 1653, 1606. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (H; mult.;  $J$  em Hz; int.): 5,24 (H-1'';  $d$ ; 7,3; 1H); 7,70 (H-2';  $d$ ; 2,0; 1H); 6,85 (H-5';  $d$ ; 8,5; 1H); 6,17 (H-6;  $d$ ; 2,0; 1H); 7,56 (H-6';  $dd$ ; 8,5 e 2,0; 1H); 6,38 (H-8;  $d$ ; 2,0; 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 158,4 (C-2), 135,8 (C-3), 179,5 (C-4), 163,0 (C-5), 99,8 (C-6), 166,0 (C-7), 94,7 (C-8), 159,0 (C-9), 105,7 (C-10), 123,0 (C-1'), 116,0 (C-2'), 145,9 (C-3'), 149,8 (C-4'), 117,5 (C-5'), 123,1 (C-6'), 104,2 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,4 (C-3''), 71,2 (C-4''), 78,1 (C-5''), 62,5 (C-6''). Todos os dados espectrais estão de acordo com o descrito na literatura<sup>17</sup>.

## Ensaio biológico

O extrato etanólico bruto e as frações semipurificadas foram ensaiados com alface, *Lactuca sativa* cv Grand Rapids, marca Isla Pak, e cebola, *Allium cepa* cv Baía Periforme, marca Feltrin.

Os bioensaios de germinação e crescimento foram realizados nos Laboratórios de Sementes e de Química do Núcleo de Ciências Agrárias – UFMS. Para os bioensaios de germinação, aplicou-se a metodologia descrita por Nishimura *et al.*<sup>18</sup>. Nas placas de Petri foram colocados discos de papel-filtro Whatmann número 1 (5,5 cm de diâmetro), umedecidos com 1 mL de solução do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg/L. Após a evaporação do solvente, foi adicionado 1,5 mL de Tween 80 (100 mg/mL) e o conjunto deixado em repouso por 12 h. Em seguida, cada disco de papel recebeu 50 diásporos das espécies alvo (alface/cebola), distribuídas aleatoriamente, com quatro repetições para cada extrato/fração, conforme recomendado na literatura<sup>19</sup>. Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém, aplicando-se somente o solvente, sem o extrato/frações. As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas ao germinador, marca Eletrolab Modelo LA, com condições de luz (160 W) e temperatura (25 °C alface, 15 °C cebola,  $\pm 2$  °C) constantes, sendo os discos de papel filtro mantidos úmidos por meio de regas com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, quando necessário. A contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente, ten-

do como critério a protrusão radicular com 2 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por 3 dias consecutivos. Para os bioensaios de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Barnes *et al.*<sup>20</sup>. As medidas das radículas e do hipocótilo/coleótilo de 10 plântulas por placa foram feitas 3 dias após a germinação, utilizando-se papel milimetrado. No presente trabalho foram desenvolvidos 4 ensaios com extratos/frações de *A. tetraphyllum*, com 4 tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg/L) e 4 repetições. Cada parcela constituiu-se de 50 diásporos para a germinação e 10 para o crescimento da radícula/coleótilo. O tempo médio de germinação foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Laboriau<sup>21</sup>.

No tratamento estatístico dos dados, quando as pressuposições de aleatoriedade, normalidade e homogeneidade entre as variâncias foram atendidas, foram utilizados testes paramétricos, para comparar a hipótese de igualdade entre as médias dos tratamentos; ANOVA – análise de variância, quando os testes envolviam a comparação de mais de duas médias e, teste de Dunnet para a comparação múltipla de duas médias, ou seja, para verificar quais das concentrações do extrato/fração apresentavam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. Quando uma das pressuposições exigidas pelo modelo paramétrico não foi atendida, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis, como alternativa para a análise de variância, e de Mann-Whitney, como alternativa para o teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico bruto e frações semipurificadas das frondes verdes de *A. tetraphyllum* foram avaliados sob o ponto de vista fitoquímico e de atividade alelopática. O  $\beta$ -sitosterol foi isolado da fração hexânica do extrato bruto como um sólido branco, e sua elucidação estrutural foi possível por comparação com padrão disponível no laboratório e com a literatura<sup>10</sup>.

Análises por co-injeção com padrões em um cromatógrafo a gás levaram à identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos sintetizados a partir da transesterificação com metanol, dos respectivos ésteres etílicos isolados da fração hexânica: ácido palmítico (16:0) (59,2%), petroselinico, oleico e (Z)-vacênico (18:1) (15,7%), esteárico (18:0) (5,0%), linoléico (18:2) (3,5%), decosaenóico (22:6) (2,7%),  $\alpha$ -linolênico (18:3) (0,7%), margárico (17:0) (0,9%), araquídico (20:0) (0,8%) e beênico (22:0) (0,4%).

A substância **1** foi isolada da fração hexânica do extrato bruto. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observa-se um conjunto de sinais (singletes) com  $\delta_{\text{H}}$  entre 0,7 e 0,9 ppm, característicos de hidrogênios metílicos e um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  2,08 ppm, atribuído aos hidrogênios  $\text{CH}_3-29$  desprotegidos. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  há um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  210,8, atribuído ao carbono carbonílico de cetona. O conjunto de sinais em  $\delta_{\text{C}}$  entre 14,2 e 42,0 foram atribuídos aos carbonos metilênicos e metílicos do triterpenóide, distinguidos pelo espectro de DEPT 135°, assim como os cinco sinais em  $\delta_{\text{C}}$  entre 48,9 e 56,0, correspondentes a carbonos metínicos, indicando que a substância **1** era um triterpenóide pentacíclico. A comparação com dados da literatura<sup>12</sup>, confirmou uma perfeita correlação de  $\delta_{\text{C}}$  de **1** com a 30-normetil-lupan-20-ona.

As substâncias **2** e **3**, isoladas da fração hexânica do extrato bruto, foram identificadas, respectivamente, como hopan-22-ol e fitol, por comparação com padrão de fitol disponível no laboratório, através da análise de seus dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e com dados da literatura<sup>13,14</sup>.

A substância **4** foi isolada da fração hexânica do extrato bruto. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observa-se dubletos ( $J = 3,2$  Hz) em  $\delta_{\text{H}}$

5,11 e 4,95, que indicam se tratar de um alceno terminal. O espectro exibe também um conjunto de sinais em  $\delta_H$  entre 0,82 e 0,86, característicos de hidrogênios metílicos. O duplo dubleto ( $J^3 = 6,7$  e 4,3 Hz) em  $\delta_H$  4,18 e com integração um foi atribuído ao hidrogênio H-2, que está acoplado com os hidrogênios em  $\delta_H$  3,71 (dois duplos dubletos sobrepostos com  $J^3 = 6,7$  e 4,3 Hz), atribuídos aos dois hidrogênios diastereotópicos de C-1. No espectro de RMN de  $^{13}C$  observam-se vinte sinais. O espectro de DEPT 135° confirmou que os sinais em  $\delta_C$  140,6 e 110,4 correspondem aos carbonos de um alceno terminal. Os sinais em  $\delta_C$  65,8 e 75,1 correspondem a carbonos carbinólicos. Os demais sinais em  $\delta_C$  entre 18,3 e 39,3 sugerem uma cadeia alifática ramificada, já que no espectro de DEPT 135° se observa a existência de quatro carbonos metínicos, quatro carbonos metílicos, além de um carbono quaternário. A comparação dos dados obtidos com a literatura<sup>15</sup> permitiu a identificação de um dos diastereoisômeros do fiten-3(20)-1,2-diol.

As substâncias presentes na mistura obtida a partir da fração AcOEt do extrato bruto foram identificadas como os ácidos ferúlico e cafeico, além do p-hidroxibenzaldeído, através da análise de seus dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ , e por comparação com dados da literatura<sup>11</sup>.

A substância **5**, um sólido amarelo, foi isolada da fração AcOEt do extrato bruto. O espectro de RMN de  $^1H$  apresenta vários sinais em  $\delta_H$  entre 6,1 e 7,7 ppm, evidenciando, pela integração, a presença de cinco hidrogênios aromáticos. O padrão de substituição pôde ser definido através das constantes de acoplamento, revelando a existência de dois sistemas aromáticos: um trissubstituído, com acoplamentos  $J^3$  de 8,5 Hz entre os hidrogênios em  $\delta_H$  7,58 e 6,63 ppm, e  $J^4$  de 1,9 Hz, entre os hidrogênios em  $\delta_H$  7,68 e 7,58 ppm; e outro sistema tetrassubstituído, com acoplamentos  $J^4$  de 1,8 Hz entre os hidrogênios com  $\delta_H$  em 6,38 e 6,13 ppm. O espectro de RMN de  $^{13}C$  apresenta quinze sinais com  $\delta_C$  entre 177,3 e 94,4 ppm. O espectro de DEPT 135° revela não haverem carbonos metilênicos ou metílicos, aparecendo apenas cinco carbonos metínicos. Portanto, os demais carbonos são quaternários. As evidências espectrais são compatíveis com um esqueleto flavonol. Comparações com padrão disponível no laboratório e com de dados de  $\delta_C$  da literatura<sup>16</sup> levaram à identificação da quercetina.

A substância **6**, um sólido amarelo cristalino, foi isolada da fração AcOEt do extrato bruto. O espectro de RMN de  $^1H$  apresenta cinco sinais com  $\delta_H$  entre 6,1 e 7,7 ppm, característicos de hidrogênios aromáticos. Também apresenta um dubleto com  $\delta_H$  de 5,2 ppm e acoplamento de 7,3 Hz, característico de um acoplamento axial-axial, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico C-1", e um multipletto com  $\delta_H$  entre 3,2 e 3,6 ppm, característico de glicosídeo. O espectro de RMN de  $^{13}C$  apresenta vinte e um sinais com  $\delta_C$  entre 62,5 e 179,5 ppm. O espectro de DEPT 135° revela a existência de um carbono metilênico em  $\delta_C$  62,5 ppm e, ainda, carbonos metínicos carbinólicos característicos de glicosídeo e carbonos aromáticos. A sugestão estrutural foi do flavonóide quercetina glicosilado. O espectro de HMBC confirma que o glicosídeo está ligado ao oxigênio da posição 3 do flavonol. A comparação dos da-

dos de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}C$  com os da literatura<sup>17</sup> confirmaram a identificação da quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo.

Dentre as substâncias isoladas a partir das frondes verdes de *A. tetraphyllum*, o ácido palmítico e a quercetina foram obtidas em maior rendimento: 875,07 e 551,75 mg/kg de material vegetal seco, respectivamente.

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que o tempo médio de germinação dos aquênios de alface, quando submetidos ao extrato bruto de *A. tetraphyllum* na concentração de 1000 mg/L, foi significativamente ( $P < 0,05$ ) maior que o tempo médio apresentado pelo controle. A fração hexânica de *A. tetraphyllum* aumentou significativamente o tempo médio de germinação dos aquênios de alface em todas as concentrações ensaiadas, enquanto a fração AcOEt aumentou significativamente o tempo médio de germinação, somente na maior concentração.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das medidas do comprimento médio da radícula e do hipocótilo da alface tratada com o extrato bruto e as frações semipurificadas de *A. tetraphyllum*, em diferentes concentrações. Os dados obtidos indicam que o extrato bruto e a fração AcOEt diminuíram significativamente o crescimento médio da radícula em todas as concentrações ensaiadas.

Quanto ao comprimento médio do hipocótilo, verifica-se que o extrato bruto e a fração AcOEt inibiram significativamente o crescimento médio do hipocótilo na concentração de 1000 mg/L. Para as frações hexânica e em EtOH / H<sub>2</sub>O verificou-se um aumento significativo no comprimento do hipocótilo na concentração de 1000 mg/L; nas demais concentrações, não foram constatadas diferenças significativas ( $P > 0,005$ ).

Os dados apresentados na Tabela 3 indicam que o tempo médio de germinação das sementes de cebola, quando submetidas ao tratamento com o extrato bruto e as frações hexânica e em AcOEt de *A. tetraphyllum*, foi significativamente ( $P < 0,05$ ) maior que o tempo médio apresentado pelo controle.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados do comprimento médio da radícula e coleóptilo de cebola obtidos sob o efeito do extrato bruto e frações de *A. tetraphyllum*, em diferentes concentrações. A fração hexânica reduziu o crescimento médio da radícula nas três concentrações, já o extrato bruto reduziu apenas na menor concentração. A fração hexânica reduziu significativamente o crescimento médio do coleóptilo em todas as concentrações ensaiadas. As demais frações não apresentaram efeitos significativos, quando comparados com o controle.

Há diversos estudos descritos na literatura relatando atividades alelopáticas relevantes para muitas das substâncias presentes nas frondes verdes de *A. tetraphyllum*. Por ex., sementes de vinte e cinco diferentes espécies vegetais com valor econômico foram tratadas com óleos vegetais, com objetivo de avaliar-se o efeito desses óleos sobre a germinação de tais sementes. Observou-se que, dentre as espécies testadas, houve completa inibição de germinação sobre *Allium cepa*, *Zea mays* e *Tritium aestivum*. O óleo continha em sua composição, ácidos graxos saturados de cadeia longa, onde se desta-

**Tabela 1.** Efeito do extrato bruto e frações semipurificadas de *Adiantum tetraphyllum* no tempo médio de germinação dos aquênios de alface

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	Controle	<sup>1</sup> Germinabilidade (dias)			ANOVA F(P)	Dunnett Post hoc test
		250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	0,75 (0,13)	0,81 (0,08)	1,10 (0,41)	2,37 (0,58)	9,35 (0,025) <sup>2</sup>	a < d <sup>2</sup>
Fração hexânica	0,75 (0,09)	1,91 (0,35)	2,32 (0,26)	4,18 (0,59)	62,073 (0,000)	a < b; c; d
Fração AcOEt	0,75 (0,13)	0,67 (0,05)	0,78 (0,11)	1,10 (0,31)	4,306 (0,028)	a < d
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	0,75 (0,13)	0,65 (0,06)	0,62 (0,04)	0,69 (0,11)	1,584 (0,245)	ns

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente da média do controle;  $p > 0,05$ , pelo teste de Dunnett. <sup>1</sup>Tempo médio (Desvio padrão).

<sup>2</sup> Kruskal-Wallis (ou Mann Whitney U)

**Tabela 2.** Efeito do extrato bruto e frações semipurificadas de *Adiantum tetraphyllum* no comprimento da radícula e no da hipocótila de plântulas de alface

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	<sup>1</sup> Comprimento da radícula (mm)				ANOVA F (P)	Dunnett <i>Post hoc test</i>
	Controle	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	30,55 (3,88)	15,10 (3,34)	11,98 (1,67)	8,40 (1,24)	49,86 (0,000)	a > b; c; d
Fração hexânica	30,55 (3,88)	24,93 (12,39)	29,63 (3,12)	25,60 (4,32)	0,64 (0,599)	ns
Fração AcOEt	30,55 (3,88)	23,57 (2,56)	15,15 (4,39)	9,05 (1,54)	32,93 (0,000)	a > b; c; d
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	30,55 (3,88)	24,95 (8,51)	30,93 (1,09)	26,95 (3,02)	1,36 (0,301)	ns

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	<sup>1</sup> Comprimento do hipocótilo (mm)				ANOVA F (P)	Dunnett <i>Post hoc test</i>
	Controle	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	10,20 (1,00)	9,18 (2,44)	10,35 (1,73)	6,58 (1,53)	3,976 (0,035)	a > d
Fração hexânica	10,20 (1,00)	11,50 (4,35)	13,73 (1,29)	15,30 (2,27)	6,904 (0,065) <sup>2</sup>	a < d <sup>2</sup>
Fração AcOEt	10,20 (1,00)	12,08 (2,19)	9,65 (2,25)	6,28 (0,95)	7,946 (0,003)	a > d
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	10,20 (1,00)	11,35 (3,57)	16,53 (4,39)	15,68 (1,69)	4,374 (0,027)	a < d

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente da média do controle; p > 0,05, pelo teste de Dunnett. <sup>1</sup> Média (Desvio padrão). <sup>2</sup> Kruskal-Wallis (e Mann Whitney U)

**Tabela 3.** Efeito do extrato bruto e frações semipurificadas de *Adiantum tetraphyllum* no tempo médio de germinação de sementes de cebola

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	<sup>1</sup> Germinabilidade (dias)				ANOVA F (P)	Dunnett <i>Post hoc test</i>
	Controle	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	5,83 (0,60)	7,47 (0,27)	7,07 (0,34)	6,46 (0,82)	6,798 (0,006)	a < b; c
Fração hexânica	5,83 (0,60)	5,98 (0,42)	7,35 (0,67)	8,11 (0,66)	13,657 (0,000)	a < c; d
Fração AcOEt	5,83 (0,60)	7,60 (0,52)	6,37 (0,43)	6,75 (0,27)	10,086 (0,001)	a < b; d
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	5,83 (0,60)	5,44 (0,26)	6,27 (0,46)	6,91 (1,47)	2,281 (0,131)	ns

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente da média do controle; p > 0,05, pelo teste de Dunnett. <sup>1</sup> Média (Desvio padrão da média)

**Tabela 4.** Efeito do extrato bruto e frações semipurificadas de *Adiantum tetraphyllum* no comprimento médio da radícula de plântulas de cebola

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	<sup>1</sup> Comprimento da radícula (mm)				ANOVA F (P)	Dunnett <i>Post hoc test</i>
	Controle	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	4,95 (0,70)	3,28 (0,39)	4,00 (0,72)	3,95 (0,72)	4,547 (0,024)	a > b
Fração hexânica	4,95 (0,70)	3,83 (0,38)	3,50 (0,56)	3,43 (0,34)	7,491 (0,004)	a > b; c; d
Fração AcOEt	4,95 (0,70)	4,13 (0,65)	4,88 (0,67)	3,80 (0,54)	3,100 (0,067)	ns
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	4,95 (0,70)	5,63 (0,59)	5,05 (0,19)	4,23 (0,35)	5,292 (0,015)	ns

<i>Adiantum tetraphyllum</i>	<sup>1</sup> Comprimento do coleótilo (mm)				ANOVA F (P)	Dunnett <i>Post hoc test</i>
	Controle	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>		
Extrato bruto	8,03 (0,95)	6,23 (0,48)	7,25 (0,59)	6,88 (1,20)	3,097 (0,067)	ns
Fração hexânica	8,03 (0,95)	6,08 (0,83)	5,90 (0,41)	5,70 (0,62)	8,635 (0,003)	a > b; c; d
Fração EtOH / H <sub>2</sub> O	8,03 (0,95)	9,05 (0,92)	8,08 (0,43)	7,13 (0,38)	8,462 (0,037) <sup>2</sup>	ns <sup>2</sup>
Fração AcOEt	8,03 (0,95)	7,33 (1,14)	7,88 (0,25)	7,25 (0,37)	1,008 (0,423)	ns

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente da média do controle; p > 0,05, pelo teste de Dunnett. <sup>1</sup> Média (Desvio padrão). <sup>2</sup> Kruskal-Wallis (e Mann Whitney U)

cavam os ácidos palmítico e oléico<sup>22</sup>. Também há relatos na literatura identificando os ácidos oléico, esteárico e mirístico<sup>23</sup>, palmítico, linoléico e linolênico<sup>24</sup> e outros ácidos graxos de cadeia longa<sup>25</sup> como agentes alelopáticos, sendo que os ácidos mirístico e palmítico são os mais potentes inibidores de germinação do sorgo<sup>26</sup> e a capacidade inibitória é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia carbônica dos ácidos<sup>27</sup>. Os ácidos graxos saturados e insaturados são substâncias comuns em vegetais e, evolutivamente, são importantes para as pteridófitas, já que constituem uma barreira contra a perda de água<sup>28</sup>.

Os ácidos ferúlico e cafeíco possuem largos espectros de atividades alelopáticas, inibindo o crescimento e a germinação de uma extensa variedade de espécies de plantas<sup>29</sup>.

A quercetina e seus glicosídeos são agentes alelopáticos que têm sido isolados de várias espécies vegetais, dentre elas, a samambaia *Gleichenia pectinata*<sup>6</sup>, *Macaranga tanarius*<sup>30</sup>, *Plume*

*armeniaca*<sup>31</sup>, *Pluchea lanceolata*<sup>32</sup> e *Castanea sativa*<sup>33</sup>. A quercetina foi ensaiada *in vitro* frente a culturas de pólenes imaturos de *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), observando-se que, em baixas concentrações, ocorre o estímulo ao desenvolvimento, à germinação e ao crescimento do tubo de polinização do vegetal<sup>34</sup>.

Todas as substâncias identificadas são inéditas em *Adiantum tetraphyllum*, já que não existem estudos químicos relatados na literatura com essa espécie. Os triterpenóides 30-normetil-lupan-20-ona e hopan-22-ol já foram isolados anteriormente a partir de outras espécies do gênero *Adiantum*<sup>12,35</sup>. Os flavonóides quercetina e quercetina-3-O-β-D-glicosídeo também já foram obtidos a partir de vegetais do gênero *Adiantum*<sup>36</sup> e são substâncias comuns na família Pteridaceae, assim como os fenilpropanóides<sup>28</sup> (ácidos ferúlico e cafeíco).

Os diterpenóides fitol e fiteno-3(20)-1,2-diol são de relato inédito para o gênero *Adiantum*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. A. Salino (UFMG) e Me. L. P. Clemente (UFGD), botânicos responsáveis pela identificação do material vegetal. À bióloga I. Azambuja. À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS), à UFMS e ao Exército Brasileiro pelo apoio financeiro. Ao CNPq/FUNDECT pelas bolsas de apoio técnico e de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

1. Tryon, R. M.; Tryon, A. F.; *Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America*, Springer-Verlag: New York, 1982.
2. Windisch, P. G.; *Tese de Livre-Docência*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil, 1983.
3. Queiroz, M. H.; *Tese de Doutorado*, École Nationale du Gênie Rural des et de Forêts, França, 1994.
4. Saito, K.; Nagao, T.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1605.
5. Peres, M. T. L. P.; Barbosa, L.; Faccenda, O.; Hess, S. C.; *Acta Botanica Brasílica* **2004**, *18*, 723.
6. Peres, M. T. L. P.; Pizzolatti, M. G.; Queiroz, M. H.; Yunes, R. A.; *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **1998**, *33*, 131.
7. Munesada, K.; Siddiqui, H. L.; Suga, T.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1533.
8. Shiojima, K.; Sasaki, Y.; Ageta, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 268; Shiojima, K.; Arai, Y.; Kasama, T.; Ageta, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 262; Shiojima, K.; Arai, Y.; Nakane, T.; Ageta, H.; Cai, S.Q.; *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 630; Nakane, T.; Arai, Y.; Masuda, K.; Ishizaki, Y.; Ageta, H.; Shiojima, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 543; Mukerjee, K. S.; Brahmachari, G.; Chatterjee, D.; Mukerjee, P.; *J. Indian Chem. Soc.* **2001**, *78*, 267; Husson, G. P.; Vilgines, R.; Delaveau, P. A.; *Pharmacology* **1986**, *44*, 41; Khosa, R. L.; Wahl, A. K.; Mukherjee, A. K.; *Current Science* **1978**, *47*, 624.
9. Maia, E. L.; Rodrigues-Amaya, D. B.; *Revista do Instituto Adolf Lutz* **1993**, *53*, 27.
10. Wright, J. L. C.; Mc Innes, A. G.; Shimru, S.; Smith, D. G.; Walter, J. A.; Idle, D.; Khalil, W.; *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1898.
11. Pouchert, C. J.; Behnke, J., eds.; *The Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spectra*, Aldrich: Wisconsin, 1993.
12. Alam, M. S.; Chopra, N.; Ali, M.; Niwa, M.; *Phytochemistry* **2000**, *54*, 215.
13. Ageta, H.; Shiojima, K.; Suzuki, H.; Nakamura, S.; *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1939.
14. Chaves, M. H.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1996.
15. Brown, G. D.; *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1553.
16. Markham, K. R.; *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press: London, 1982.
17. Gupta, M.; Bagchi, A.; Roy, S. K.; Ray, A. B.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 86; Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; *The flavanoids – Advances in research*, Chapman and Hall: London, 1982.
18. Nishimura, H.; Nakamura, T. M. J.; Mizutani, J.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2777.
19. Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; *Regras para análise de sementes*, SNDA/DNDU/CLU: Brasília, 1992.
20. Barnes, J. P.; Putnam, A. R.; Burke, B. A.; Assen, A. J.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1385.
21. Laboriau, L. G.; *A germinação das sementes*, Série de Biologia. Monografia 24, OEA - Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico: Brasília, 1983.
22. Shabelski, E.; Yaniv, Z.; *Seed Sci. Technol.* **1998**, *26*, 571.
23. Rice, E. L.; *Allelopathy*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press: New York, 1984.
24. Peterson, J. K.; Harrison, H. F.; Snook, M. E.; *Allelopathy J.* **2002**, *9*, 177.
25. Xuan, T. D.; Tsuzuki, E.; *Allelopathy J.* **2004**, *13*, 137; Pramanik, M. H. R.; Nagai, M.; Asao, T.; Matsui, Y.; *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1953.
26. Marambe, B.; Nagaoka, T.; Ando, T.; *Plant Cell Physiol.* **1993**, *34*, 605.
27. Edney, N. A.; Rizvi, M.; *J. Environ. Sci. Health, Part B* **1996**, *31*, 269.
28. Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.; *Biologia Vegetal*, 5<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996.
29. Mann, J.; *Secondary metabolism*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford Science Publications: New York, 1986; Lehman, M. E.; Blum, U.; *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2585; Lehman, M. E.; Blum, U.; *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1517; Beleroni, C. R. S.; Ferrarese, M. L. L.; Souza, N. E.; Ferrare, O.; *Biologia Plantarum* **2000**, *43*, 313.
30. Tseng, M. H.; Kuo, Y. H.; Chen, Y. M.; Chou, C. H.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 1269.
31. Rawat, M. S. M.; Pant, G.; Prasad, D.; Joshi, R. K.; Pande, C. B.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 13.
32. Inderjit, D. K. M. M.; Dakshini, K. M. M.; *Allelopathy*, ACS Symposium Series 1995, vol. 582, p. 86.
33. Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Cobianchi, R. C.; Vuotto, M. L.; Ferrara, L.; *Fitoterapia* **2000**, *71*, s110, suppl. 1.
34. Ylstra, B.; Touraev, A.; Moreno, R. M. B.; Stoger, E.; Vantunen, A. J.; Vicente, O.; Mol, J. N. M.; Heberlebers, E.; *Plant Physiology* **1992**, *100*, 902.
35. Shiojima, K.; Arai, Y.; Ageta, H.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1079.
36. Imperato, F.; *Chem. Ind.* **1982**, *16*, 604.