

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Impacto do Boro na Produtividade de Grãos,
Teor e Qualidade do Óleo e Potencial Biológico
de Extratos de Folha e Capítulo de Girassol**

Luiziane Soares Alves

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**IMPACTO DO BORO NA PRODUTIVIDADE DE GRÃOS, TEOR E
QUALIDADE DO ÓLEO E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
EXTRATOS DE FOLHA E CAPÍTULO DE GIRASSOL**

LUIZIENE SOARES ALVES

Sob a Orientação das Professoras

Sonia Regina de Souza (*in memoriam*)

Rosane Nora Castro

e Coorientação dos Professores

André Marques dos Santos

Munir Mauad

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química

Seropédica, RJ
Janeiro de 2019

A474i Alves, Luiziene Soares, 1988-
Impacto do boro na produtividade de grãos, teor e
qualidade do óleo e potencial biológico de extratos de
folha e capítulo de girassol. / Luiziene Soares
Alves. - 2019.
71 f.: il.

Orientadora: Rosane Nora Castro.
Coorientador: André Marques dos Santos.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós-graduação em Química, 2019.

1. Helianthus annuus L.. 2. capacidade
antioxidante. 3. potencial alelopático. I. Castro,
Rosane Nora, 1965-, orient. II. Santos, André Marques
dos, 1977-, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Pós-graduação em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUIZIENE SOARES ALVES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 24/01/2019

André Marques dos Santos – IQ-UFRRJ
(Coorientador - presidente)

Ednaldo da Silva Araújo – Embrapa-RJ

Carlos Vergara Torres Júnior – Embrapa-RJ

Manlio Silvestre Fernandes – IA- UFRRJ

Cristiano Jorge Riger – IQ-UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade amiga que me proporcionaram a felicidade de encerrar mais um ciclo em minha vida e de conhecer pessoas maravilhosas que tornaram a minha caminhada mais prazerosa. E pela oportunidade de aprimoramento intelectual.

Aos meus pais Luiz Carlos e Rosemara e minhas irmãs, minha família querida por todo carinho e compreensão, que nunca negou esforços em me ajudar para eu chegar até aqui. Agora já somos nove! Em especial a minha “irmã” Luizemara que me apoia de todas as maneiras para a realização de meus sonhos.

À professora Sonia Regina de Souza (*in memoriam*), que tive o imenso prazer de termos trabalhado juntas, me orientou desde a graduação com carinho e amizade, e sempre acreditou no meu trabalho. Seus ensinamentos já se tornaram parte de mim.

Ao meu co-orientador André Marques dos Santos, o orientador mais “fo fis” do IQ, meu porto seguro durante o doutorado, sempre com paciência e carinho para ensinar.

Ao meu outro co-orientador Munir Mauad que se disponibilizou de pronto a me ajudar e a participar da minha caminhada. Que foi para o campo coletar girassol comigo, com todo carinho, paciência e bom humor acima de tudo.

À minha orientadora Rosane Nora Castro, que aceitou com todo carinho esta “desorientada”, que caiu de paraquedas na sua vida, cuja orientação foi fundamental para a finalização da minha tese.

À todos do laboratório de Bioquímica de Plantas, aos professores Marcelo de Freitas Lima e Flavio Couto Cordeiro, ao aluno Rodolfo Guimarães Pedroso, em especial, as minhas amadas alunas de iniciação científica que foram fundamentais para a realização do meu trabalho: Victória Cardin Alfano Raposo, Larissa Gasparelo Moraes, Camila Barbosa e Bruna Borges.

À minha amiga de bancada e brigadeiro Marcela Jacques de Lemos Neves, pelo apoio e parceria.

Ao laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, que esteve de portas abertas para que eu pudesse finalizar meu trabalho com sucesso. Em especial ao professor Manlio Silvestre Fernandes que sempre me recebe com um abraço, disposto a tirar dúvidas e incentivar meu trabalho.

Ao laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos, em especial ao Dr. Cristiano Jorge Riger pela parceria e incentivo a pesquisa, e a aluna de doutorado Edlene Ribeiro Prudêncio que além de companheira de trabalho, tornou-se uma amiga querida.

Ao Laboratório de Química Medicinal e Química do Mel pela infraestrutura e apoio para as realizações das minhas análises. Em especial ao estudante de mestrado Lucas Pires de Oliveira por sua contribuição e parceria.

À minha amiga querida Shirlei Assunção, e aos queridos Carlos Vergara Torres Júnior, Orlando Carlos Huertas Tavares e Diego de Mello Conde Brito que demonstraram amizade e disponibilidade em me ajudar.

Às minhas amigas para toda hora sempre dispostas a me aconselhar e incentivar Elvia Mariam Lis Martinez Stark, Elizabeth Teixeira Ramos, Tatiana Faria Maia, Thayane de Melo Soares, Patrícia Matias, Bárbara Costa, Kátia Pereira Coelho e Cassiane Alves do Nascimento.

Aos meus irmãos de fé pelo apoio emocional e amizade Liliane Kiffer, Thiago Trindade, Joana Regina Flausino, Luciene Sousa, Bárbara Menezes, Jupira Sampaio, Antônio José de Andrade Júnior e Isabel Cristina da Silva Nascimento.

À todos os funcionários do Instituto de Química presentes no meu dia-a-dia sempre com um bom dia e um sorriso de incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e a UFRRJ por proporcionarem recursos e infraestrutura para a condução do meu trabalho e oportunidade de aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

ALVES, Luiziane Soares. **Impacto do boro na produtividade de grãos, teor e qualidade do óleo e potencial biológico de extratos de folha e capítulo de girassol.** 2019. 71p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O girassol tem destaque na indústria alimentícia pela qualidade do seu óleo. Suas propriedades vêm despertando especial interesse nas pesquisas químicas devido aos seus metabólitos especiais com potencial biológico. Um fator limitante para essa cultura é a disponibilidade de boro, que atua em processos fisiológicos e morfológicos e, portanto, reflete em aspectos químicos e agrônômicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade de grãos, o teor e a qualidade do óleo do girassol, bem como o potencial antioxidante e alelopático de extratos de tecidos de girassol cultivados sob fornecimento diferencial de boro. No experimento de campo, três genótipos de girassol (Helio251, BRS323 e BRS324) receberam diferentes doses de boro: 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹. A sensibilidade ao boro foi avaliada através do montante de grãos produzidos, teor e qualidade do óleo, e quantidade de boro presente nos grãos. O potencial biológico foi determinado no genótipo mais sensível ao boro (Helio251). Foram preparados extratos aquosos (0,1 e 0,5%) e etanólicos (0,025 e 0,050%) com tecidos de folhas e capítulos coletados no campo durante a fase R5. Posteriormente, ensaios *in vitro* e *in vivo* permitiram estimar a capacidade antioxidante. Adicionalmente, para os extratos aquosos (2,5; 5 e 10%) de folha e capítulo foi realizada a avaliação do potencial alelopático sobre a germinação de *Digitaria insularis*. Como resultado, no experimento de campo, os genótipos apresentaram respostas diferenciadas à adubação com boro. Este micronutriente influenciou a produtividade de grãos nos genótipos Helio251 e BRS323, e no teor de óleo em todos os genótipos. No entanto, a adição de boro não foi correlacionada ao perfil dos ácidos graxos insaturados majoritários e proteína no grão. Apesar disso, foi verificada a diferença genotípica na qualidade do óleo, tanto no parâmetro dos ácidos graxos quanto no teor de proteína bruta. A avaliação dos extratos hidroalcoólicos e aquosos de folhas e capítulo nos ensaios químicos confirmou a presença de substâncias fenólicas, a capacidade antioxidante (testes de ABTS e FRAP) e ausência de flavonoides. Através da análise por CLAE-DAD., foi confirmada a presença de substâncias antioxidantes clorogênicas em ambos os tipos de extrações. Nos ensaios *in vivo*, com o modelo biológico *Saccharomyces cerevisiae*, extratos aquosos e etanólicos de plantas cultivadas sob condições adequadas de B apresentaram atividade antioxidante. No entanto, o extrato de capítulo nas mesmas condições protegeu mais as leveduras dos danos oxidativos. Este trabalho permitiu a observação das múltiplas funções do B, e potencial biológico nos extratos de folhas e capítulos de girassol. O micronutriente pode influenciar a produção da cultura do girassol tanto de maneira negativa quanto positiva, a depender da dose aplicada e do genótipo escolhido. Em síntese, a quantidade de substâncias de caráter antioxidante é alterada de acordo com a dose de B fornecida. Além disso, o girassol possui metabólitos especiais com potencial alelopático e antioxidante com potencialidade para aplicação nas indústrias química e agrícola.

Palavras-chave: *Helianthus annuus* L., capacidade antioxidante, potencial alelopático

ABSTRACT

ALVES, Luiziene Soares. **Impact of boron on grains productivity, content and quality of the seed oil, and biological potential of leaf and capitulum extracts of sunflower.** Thesis (PhD in Chemistry, Agro-biochemistry). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The use of sunflower on food industry is valuable, due to its high grain productivity and oil quality. Some inherent properties of sunflower have been generating special interest on chemical research because of special metabolites with biological potential. Nevertheless, a limiting factor to be considered for sunflower characteristics is the nutrient availability. Regarding essential micronutrients for desirable productivity and oil quality, it is noticed that sunflower's culture has high sensibility to excessive input of Boron element (B). This element acts on physiological and morphological processes and, therefore, it affects chemical and agronomic aspects. This work aims to evaluate sunflower's grain productivity, content and quality of the seed oil. Moreover, the biological potential of sunflower's tissue extracts grown under differential boron supply. During field experiments, three sunflower's genotypes (Helio251, BRS323 and BRS324) were supplied with different doses of B: 0, 2.5, 5 and 8 kg ha⁻¹. The B sensibility was evaluated using the amount of grains, content and quality of the seed oil, and B content in grains. The biological potential was determined using the highest B-sensitive genotype (Helio251). Aqueous (0.1 and 0.5%) and ethanolic (0.025 and 0.050%) extracts were produced using leaf and capitulum tissues, which were collected during R5 field stage. Afterwards, "in vitro" and "in vivo" assays led us to estimate antioxidant capacity and activity, respectively. Furthermore, aqueous extracts of leaf and capitulum (2.5, 5 and 10%) were evaluated in relation to its allelopathic potential on seed germination of *Digitaria insularis*. As a result, genotypes showed distinct response for B fertilization on field experiment. This micronutrient influenced grain productivity of the Helio251 and BRS323, and oil content in all genotypes. However, B was not recognized on major unsaturated fatty acid profiles and grain protein. Despite of that, it was observed genotypical differences in oil quality, either on fatty acid parameters or on crude protein content. *In vitro* evaluation of hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves and capitulum using ABTS and FRAP confirmed phenolic content, absence of flavonoids and antioxidant capacity. Also, the *Saccharomyces cerevisiae* biological model shown antioxidant activity in aqueous and ethanolic extracts using "in vivo" assays. In the other hand, some better values for antioxidant activity were found using ethanol as extraction solvent. In HPLC-PDA analysis, it was confirmed chlorogenic antioxidant compounds. As a result, this work led us to evidence multiple functions of B, and its biological potential in sunflower leaves and capitulum extracts. It was noticed that B element influences sunflower crop production either negatively or positively, depending on the applied dose and genotype. In summary, the amount of antioxidant components may change with variations of B supply. Moreover, sunflower has special metabolites with allelopathic and antioxidant contents that have potential to be useful for both chemical and agricultural industries.

Key-words: *Helianthus annuus* L., antioxidant capacity, allelopathic potential.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise química de amostras compostas de solo (0-20 cm e 20-40 cm de profundidade), coletadas na área experimental na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, município de Dourados-MS.....	22
Tabela 2 Teor de B nos capítulos na 1ª coleta (fase R5) e nos capítulos e grãos na 2ª coleta (final do ciclo) dos genótipos de girassol BRS323, BRS324 e Helio251, cultivados sob diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹), na fazenda experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (MS).....	33
Tabela 3 Percentual de proteína bruta nos grãos de diferentes genótipos de girassol (BRS323, BRS324, Helio251) submetidos a adubação diferenciada de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹).	36
Tabela 4 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos genótipos de girassol Helio251, BRS323 e BRS324, cultivados na Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados-MS.....	37
Tabela 5 Teores (%) de ácido linoleico e oleico presentes no óleo dos genótipos de girassol BRS 323, BRS 324, Helio251 cultivados com diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹), aplicadas no plantio.	38
Tabela 6 Teores (%) de ácido palmítico e esteárico presentes no óleo dos genótipos de girassol BRS 323, BRS 324, Helio251 cultivados com diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg ha ⁻¹), aplicadas no plantio.	39
Tabela 7 Fenólicos totais e FRAP dos extratos foliares dos tipos aquosos e hidroalcoólicos de plantas de girassol (Helio251), cultivadas com diferentes doses de B no campo.	47
Tabela 8 Fenólicos totais, FRAP e ABTS dos extratos de capítulo dos tipos aquoso e hidroalcoólico de plantas de girassol (Helio251) cultivadas com 2,5 kg.ha ⁻¹ de B no campo.	49
Tabela 9 Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de capim-amargoso tratadas com diferentes doses de extrato aquoso de folha e capítulo de girassol.	56
Tabela 10 Extravasamento de eletrólitos de sementes e plântulas de capim-amargoso submetidas a diferentes tratamentos com extrato aquoso de folha e capítulo de girassol.	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Aleloquímicos encontrados em folhas de girassol cv. Peredovick. 1- helivypolido D, 2- helivypolido E, 3- leptocarpin, 4- annuolido F, 5- 8 β -angeloiloxicumambranolido, 6- heliannuol J, 7- deidrovomifoliol, 8- Annuinono D, 9- heliannono A, 10- kukulkanino B, 11- heliannona B, 12- tambulina e 13- (+)-loliolido (MACIAS et al. 1999)..... 2
- Figura 2** Imagem ilustrativa do receptáculo floral: A- Flores Tubulares. B- Flores liguladas. Foto capturada na fase R5 do cultivo do girassol, em 28/03/2016 (Fonte: o autor). 4
- Figura 3** Representação das fases do estágio reprodutivo (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 e R9) de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação, conforme descritas por Schneiter; Miller (1981); Alves (2014)..... 5
- Figura 4** Esquema simplificado do transporte de B através dos canais NIP5;1 e NIP6;1 e do transportador BOR1 presentes nas plantas em condições de abundantes ou escassas do nutriente (adaptado de PRINCI et al., 2015). 8
- Figura 5** Esquema simplificado da biossíntese de substâncias fenólicas a partir da fenilalanina (TAIZ; ZEIGER, 2013)..... 12
- Figura 6** Estruturas químicas: derivados do ácido cinâmico (A), derivados do ácido benzóico (B). 13
- Figura 7** Esquema simplificado do balanço hormonal (ABA e etileno) e de formação de EROs durante a germinação de sementes de mostarda embebidas em água ou no extrato foliar de girassol (adaptado de BOGATEK; GNIAZDOWSKA, 2007)..... 18
- Figura 8** Cultivo dos genótipos de girassol (BRS324, BRS323 e Helio251) com diferentes doses de boro na área experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). A- Aplicação dos tratamentos com B (0; 2,5; 5 e 8 kg. ha⁻¹); B- 10 DAE (estágio V2), realização do desbaste; C- plantas no estágio R5, primeira coleta; D- Plantas no final do ciclo (estágio R9), segunda coleta..... 22
- Figura 9** A e B - digestão sulfúrica das amostras de grãos trituradas, dentro da capela de exaustão; C- destilação por arraste a vapor; D- titulação das amostras. 23
- Figura 10** Procedimento de extração do óleo no extrator de Soxhlet, filtração do solvente e evaporação do solvente em rota evaporador..... 24
- Figura 11** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* tratadas com extrato aquoso e etanólico de girassol, sob estresse oxidativo. 29
- Figura 12** Curvas de regressão do comportamento dos genótipos de girassol Helio251, BRS323 e BRS324 em função das doses de B aplicada no campo (0; 2,5; 5; e 8 kg.ha⁻¹). A - Teores de B nos capítulos + grãos (mg.kg⁻¹). B- Produtividade de grãos (g.planta⁻¹). C- Número de grãos produzidos por planta. D- Teor de óleo (%). 35

Figura 13 Correlação entre os teores de óleo (%) e o número de grãos produzidos dos genótipos de girassol BRS323 e Helio251.	35
Figura 14 Estruturas dos quatro principais ácidos graxos encontrados no óleo de girassol.	37
Figura 15 Efeito da característica genotípica no perfil dos ácidos graxos presente no óleo de diferentes genótipos de girassol (BRS323, BRS324 e Helio251).	39
Figura 16 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo Helio251 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹ de B.	40
Figura 17 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo BRS323 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹ de B.	41
Figura 18 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo BRS324 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha ⁻¹ de B.	42
Figura 19. Curvas de regressão dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de folhas de plantas de girassol (Helio251) submetidas a diferentes doses de B no campo (0; 2,5 e 5 kg.ha ⁻¹). A - Curvas de regressão dos teores de fenólicos totais dos extratos aquoso e hidroalcoólico. B - Curvas de regressão da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) dos extratos hidroalcoólicos e aquosos. C - Curvas de regressão da capacidade antioxidante pelo método ABTS dos extratos hidroalcoólicos e aquosos.	44
Figura 20 Perfil químico do extrato hidroalcoólico de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha ⁻¹ de B por CLAE-DAD em fase reversa.	45
Figura 21 Perfil químico do extrato aquoso de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha ⁻¹ de B por CLAE-DAD em fase reversa.	45
Figura 22 Substâncias identificadas por CLAE-DAD no extrato aquoso e hidroalcoólico de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha ⁻¹ de B.	46
Figura 23 (A) Teores de fenólicos totais encontrados nos extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. (B) Capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) de extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. (C) Capacidade antioxidante pelo método ABTS de extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. As barras representam o erro padrão médio das repetições, e seguidas das mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.	48
Figura 24 Ensaios de viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após 1 h de exposição ao agente estressante H ₂ O ₂ (1,0 mM) e com pré-tratamentos com extratos etanólico e aquosos de folhas de girassol (Helio251) por 2 h. A - Extrato aquoso de folhas de plantas submetidas a dose de 2,5 kg.h ⁻¹ de B no campo. B - Extrato aquoso de folhas de plantas submetidas a dose de 8 kg.h ⁻¹ de B no campo. C - Extrato etanólico de folhas de plantas submetidas a dose de 2,5 kg.h ⁻¹ de B no campo. D - Extrato etanólico de folhas de plantas submetidas a dose de 8 kg.h ⁻¹ de B no campo. As barras de erro representam o erro padrão médio (n=3). Os tratamentos seguidos das mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.	50

Figura 25 Gráfico de viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após 1 h de exposição ao agente estressante H ₂ O ₂ (1,0 mM), e com pré-tratamento com extrato aquoso de capítulo de girassol (Helio251) nas concentrações de 0,1 e 0,5%. As barras de erro representam o erro padrão médio (n=3). Os tratamentos seguidos das mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. .	51
Figura 26 Ensaio para teste de atividade alelopática de extratos de folhas de girassol em diferentes concentrações (0; 2,5; 5 e 10%), sobre a germinação de capim-amargoso....	54
Figura 27 Ensaio para teste de atividade alelopática de extratos de capítulos de girassol em diferentes concentrações (0; 2,5; 5 e 10%), sobre a germinação de capim-amargoso.	54
Figura 28 Gráfico de sobrevivência das sementes de capim-amargoso durante 7 dias de tratamento com extratos de folha e capítulos de girassol.	55
Figura 29 Extravasamento de eletrólitos (CE) das sementes submetidas a diferentes doses de extrato aquoso de folha e capítulo de girassol. As barras representam o erro padrão médio das repetições.	57
Figura 30 Perfil químico do extrato aquoso de folha por CLAE-DAD.	59
Figura 31 Perfil químico do extrato aquoso de capítulo por CLAE-DAD.	59
Figura 32 Comparação do perfil químico dos extratos aquosos de capítulo (rosa) e folha (preto) por CLAE-DAD à 280nm.	60

LISTAS DE ABREVIACÕES

ABTS	2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfnico)
CAT	Catalase
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometro de massa
CLAE-DAD	Cromatografia liquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GPx	Glutathiona peroxidase
IVG	ndice de velocidade de germinação
SOD	Superóxido dismutase
YPD	Yeast/Peptone/Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O GIRASSOL.....	4
2.2 O MICRONUTRIENTE BORO (B)	7
2.3. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....	10
2.4 ALELOPATIA.....	15
3 OBJETIVO.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 HIPÓTESES.....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 PRODUÇÃO DE GRÃOS, TEOR E QUALIDADE DO ÓLEO DE TRÊS GENÓTIPOS DE GIRASSOL SOB DIFERENTES DOSES DE BORO	21
5.1.1 <i>Área e condução do experimento</i>	21
5.1.2 <i>Determinação de B no material vegetal</i>	23
5.1.3 <i>Determinação do teor de proteína bruta</i>	23
5.1.4 <i>Extração do óleo</i>	24
5.1.5 <i>Análise do perfil do óleo por cromatografia em fase gasosa</i>	24
5.1.6 <i>Análise estatística</i>	25
5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE GIRASSOL.....	25
5.2.1 <i>Preparo dos extratos</i>	25
5.2.2 <i>Determinação de fenólicos totais</i>	26
5.2.3 <i>Determinação de flavonoides totais</i>	27
5.2.4 <i>Testes químicos para a capacidade antioxidante</i>	27
5.2.5 <i>Ensaio biológico para capacidade antioxidante</i>	28
5.2.6 <i>Análise qualitativa dos extratos por CLAE-DAD</i>	29
5.2.7 <i>Análise estatística</i>	30
5.3 POTENCIAL ALELOPÁTICO DE EXTRATOS DE FOLHAS E CAPÍTULOS DE GIRASSOL SOBRE A GERMINAÇÃO DE <i>DIGITARIA INSULARIS</i>	30
5.3.1 <i>Condução do experimento</i>	30
5.3.2 <i>Métodos analíticos</i>	31
5.2.3 <i>Índice de velocidade de germinação (IGV)</i>	31
5.3.4 <i>Extravasamento de eletrólitos</i>	31
5.3.6 <i>Análise estatística</i>	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1 PRODUÇÃO DE GRÃOS, TEOR E QUALIDADE DO ÓLEO DE TRÊS GENÓTIPOS DE GIRASSOL SOB DIFERENTES DOSES DE BORO	32
6.1.1 <i>Análise de Boro, produtividade de grãos e teor de óleo</i>	32
6.1.2 <i>Teor de proteína bruta nos grãos</i>	36
6.1.3 <i>Qualidade do óleo</i>	36
6.1.4 <i>Conclusão parcial</i>	43
6.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE GIRASSOL.....	43
2.2.1 <i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	43
6.2.2 <i>Determinação da atividade antioxidante in vivo</i>	49

6.2.3 Conclusão parcial.....	52
6.3 POTENCIAL ALELOPÁTICO DE EXTRATOS DE FOLHAS E CAPÍTULOS DE GIRASSOL SOBRE A GERMINAÇÃO DE <i>DIGITARIA INSULARIS</i>	52
6.3.1 % de germinação e IVG	52
6.3.2 Extravasamento de eletrólitos	56
6.3.3 Análise qualitativa dos extratos por CLAE-DAD.....	58
6.3.3 Conclusão parcial.....	61
7 CONCLUSÕES	62
8 REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma oleaginosa economicamente importante, devido ao seu óleo de ótima qualidade para a indústria alimentícia. Mas suas características não se limitam apenas à produção de óleo, a planta também possui uma gama de metabólitos especiais presentes em seus tecidos que abre novas possibilidades para seu uso, podendo num futuro próximo, conquistar seu espaço na indústria química.

Dentre os fatores que podem influenciar a cultura tanto para a produção de óleo quanto para a produção de metabólitos podemos destacar a disponibilidade de nutrientes. O girassol apresenta grande sensibilidade à deficiência de boro (B) (SOUZA et al, 2004). Estudos demonstram que aplicação de B pode influenciar diretamente na produção de grãos e óleo (TAHIR et al., 2013; ALVES et al., 2017), e na viabilidade do pólen e das sementes (KRUDNAK et al., 2013). A produção de óleo de uma cultura está intimamente ligada a fatores genéticos, e as interações entre o genótipo e o meio que irão ocorrer durante seu desenvolvimento (WESELAKE et al., 2009). Portanto, cada genótipo pode responder de maneira diferenciada ao B, o que acentua a importância de analisar mais de um genótipo no campo.

Além dos parâmetros de produção da cultura, o B também pode atuar sobre processos fisiológicos como fotossíntese e o metabolismo antioxidante, entre outros (PRINCI et al., 2016). Segundo Varshney e colaboradores (2015), a diminuição da capacidade fotossintética pode induzir a síntese de metabólitos e enzimas antioxidantes nas plantas. Cervilla et al. (2007) analisaram os efeitos causados por doses elevadas de B em plantas de tomate, dentre eles observaram danos oxidativos em folhas de tomate e, segundo os autores, como resposta a planta aumentou a produção de enzimas antioxidantes e conseqüentemente de seus produtos. Portanto, pode-se supor que o estresse oxidativo causado pelo excesso de B pode aumentar o acúmulo de substâncias com característica antioxidante como, por exemplo, as substâncias fenólicas.

O boro é fundamental para a integridade estrutural da parede celular (POWER; WOODS, 1997), especificamente na síntese de pectina, celulose e lignina, e também está relacionado ao metabolismo ou à incorporação do cálcio na parede celular (RAMOS et al., 2009).

Diferentes genótipos de girassol apresentam alta produção de metabólitos especiais como fenóis e terpenos (CORSATO et al., 2010). Esta oleaginosa é rica em

terpenoides, principalmente sesquiterpenoides, os quais possuem atividade alelopática (MACIAS et al., 2002). A extração de aleloquímicos em folhas secas de girassol utilizando diclorometano, revelou através de cromatografia cerca de 13 compostos, como por exemplo, lactonas sesquiterpênicas (Figura 1) (MACIAS et al., 1999).

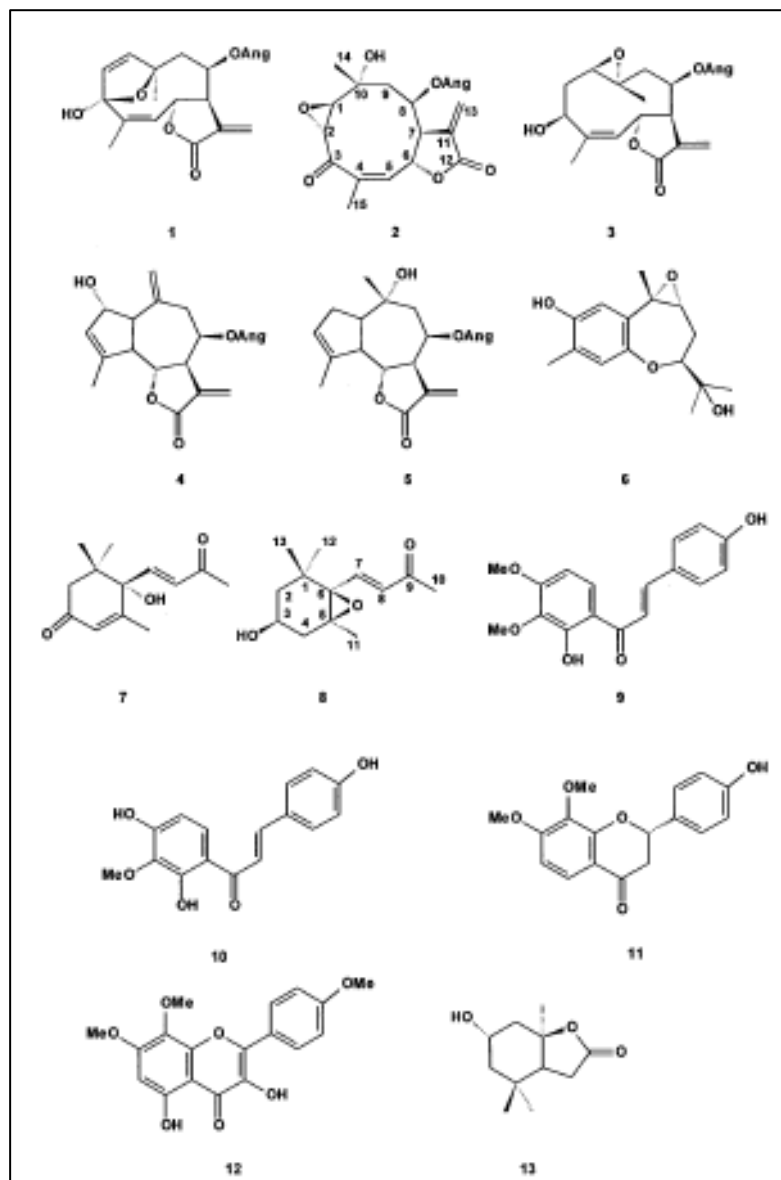


Figura 1 Aleloquímicos encontrados em folhas de girassol cv. Peredovick. **1-** helivypolido D, **2-** helivypolido E, **3-** leptocarpin, **4-** annuolido F, **5-** 8 β -angeloiloxicumambranolido, **6-** heliannuo J, **7-** deidrovomifoliol, **8-** Annuinono D, **9-** heliannono A, **10-** kukulkanino B, **11-** heliannona B, **12-** tambulina e **13-** (+)-loliolido (MACIAS et al. 1999).

Segundo Alsaadawi et al. (2012) genótipos de girassol que apresentam níveis mais elevados de substâncias fenólicas demonstraram maior capacidade alelopática para

plantas daninhas e também para o trigo. Ashrafi et al. (2008) através de um bioensaio utilizando extrato aquoso de girassol observaram inibição na germinação de plantas de cevada, sendo as folhas o tecido que apresentou o maior grau de toxicidade. Enquanto que Nikneshan et al. (2011) observaram o potencial alelopático do extrato de girassol na redução da germinação de algumas espécies de plantas daninhas presentes no cultivo de cártamo e trigo. Corsato et al., (2010) verificaram alto poder inibitório do extrato aquoso de girassol sobre a germinação de picão-preto (*Bidens pilosa* L.).

Devido ao alto potencial da cultura em diferentes aspectos, como produção de óleo, grãos e aleloquímicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes possibilidades de uso e de adubação borácica na cultura do girassol. Primeiro foi verificado até que ponto a aplicação do B é benéfica para a produção de grãos, teor e perfil de ácidos graxos do óleo, teor de proteína bruta no grão em diferentes genótipos de girassol. Segundo foi testado o potencial biológico dos extratos oriundos de folhas e capítulos coletados na fase R5, através da avaliação da sua capacidade antioxidante *in vitro* (ABTS e FRAP) e *in vivo* sobre o modelo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741). E, por fim, também foi avaliado o potencial alelopático do extrato aquoso de folha e capítulo, em diferentes concentrações, sobre a germinação de *Digitaria insularis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) pertence à família *Asteraceae*, a qual é caracterizada com um sistema radicular pivotante e inflorescência do tipo capítulo (CASTIGLIONI et al., 1997). Suas flores estão dispostas em um receptáculo floral onde encontramos flores do tipo tubulosas (férteis) e do tipo liguladas (inférteis) (Figura 2) (BORTOLINI et al., 2012). São plantas que apresentam conhecido movimento heliotrópico, o que melhora o desempenho das plantas no ambiente natural. Este movimento é coordenado pelas vias de resposta ambiental e pelo oscilador circadiano (ATAMIAN et al. 2016).



Figura 2 Imagem ilustrativa do receptáculo floral: **A**- Flores Tubulares. **B**- Flores liguladas. Foto capturada na fase R5 do cultivo do girassol, em 28/03/2016 (Fonte: o autor).

O desenvolvimento do girassol pode ser dividido em dois estágios distintos. O primeiro corresponde ao estágio vegetativo, que compreende o período de emergência e desenvolvimento verdadeiro das folhas. Já o segundo é o reprodutivo, que compreende as fases desde o aparecimento do broto floral até a maturação fisiológica da planta. A fase reprodutiva pode ser dividida em nove etapas (Figura 3), como segue: R1, surgimento do broto floral; R2, início do alongamento do broto floral; R3, segunda etapa de alongamento do broto floral; R4, início do florescimento com o aparecimento das flores liguladas; R5, surgimento das flores tubulares; R6, abertura de todas as flores tubulares e liguladas murchas; R7, início do desenvolvimento dos aquênios; R8, segunda fase de

desenvolvimento dos aquênios; R9, plantas em maturação fisiológica, com brácteas de coloração amarela ou castanha (SCHNEITER; MILLER, 1981). Entre genótipos o ciclo pode variar entre 90 a 130 dias, com florescimento por volta de 50 e 65 dias (LEITE et al., 2005).

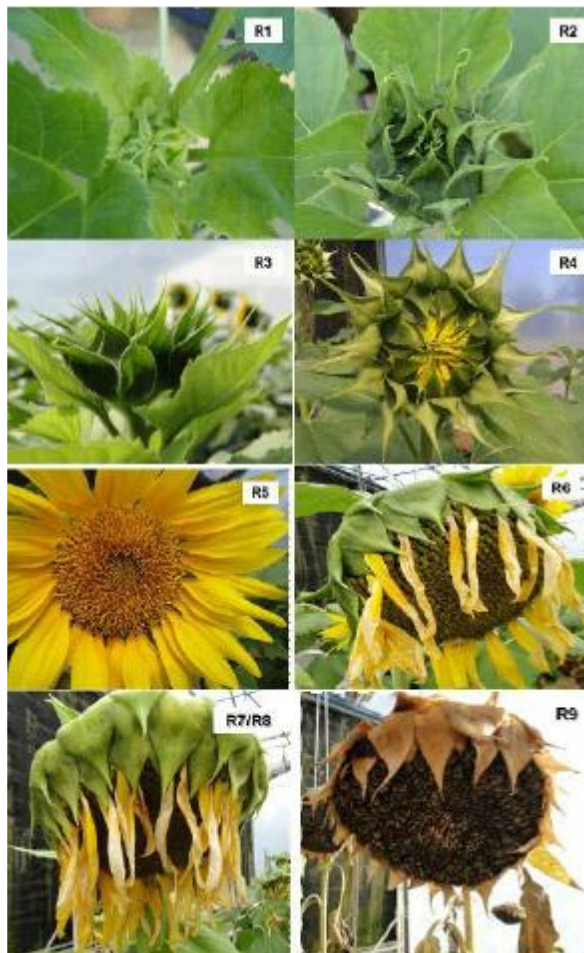


Figura 3 Representação das fases do estágio reprodutivo (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 e R9) de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação, conforme descritas por Schneiter; Miller (1981); Alves (2014).

Oleaginosas como o girassol tem como principais produtos de reserva os triacilgliceróis (TAGs) e as proteínas (TRONCOSO-PONCE et al., 2011). Os óleos vegetais, em sua maioria, são formados a partir dos TAGs armazenados nas sementes (DURRETT et al., 2008). Estes, por sua vez, são compostos por três moléculas de ácidos graxos ligados a um esqueleto de glicerol (CAGLIARI et al., 2011). A síntese de ácidos graxos nas sementes ocorre nos plastídios e a formação das moléculas de triacilgliceróis (TAGs) pode estar associada ao retículo endoplasmático ou aos corpos de óleo (BATES et al., 2013).

Sementes de girassol não possuem clorofilas, portanto não fazem fotossíntese durante seu desenvolvimento. Estas recebem o carbono, energia e os redutores equivalentes necessários a partir de fotossintatos importados do floema. Os carboidratos enviados para as sementes, que estão na forma de açúcares, são degradados pela via glicolítica. Os intermediários da via são enviados para os plastídios e metabolizados para a obtenção do acetil-CoA, o principal precursor para a síntese de ácidos graxos (SALAS et al., 2014). Os principais ácidos graxos encontrados nas sementes que também estão presentes nos lipídios de membrana são o ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 Δ^9), ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e α -linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (CAGLIARI et al., 2011).

O girassol está entre as oleaginosas com importância econômica para a indústria de alimentos devido ao óleo de boa qualidade, possuindo alto nível de ácidos graxos insaturados e alto teor de Vitamina E (BASHIR et al., 2015). Seu óleo desperta grande interesse devido a sua elevada estabilidade oxidativa e teor de ácido oleico (BILGEN et al., 2018). Seu óleo também despertou interesse na indústria do biocombustível, por causa do seu elevado teor de ésteres graxos insaturados, pois em baixas temperaturas, ésteres graxos saturados ficam mais viscosos e podem sofrer cristalização, provocando o entupimento dos filtros de óleo e do sistema de injeção (RAMOS et al., 2009). As variedades de girassol são utilizadas para diferentes finalidades, como, por exemplo, na aplicação em ornamentação, na culinária em substituição às amêndoas em geral, grãos *in natura* e em forma de farelo para uso em rações na alimentação de aves, suínos e bovinos, forragem, silagem, e na alimentação humana (PESTANA et al., 2012).

Somado à relevância agrônômica voltada a produção de grãos e óleo, o avanço nas pesquisas com a cultura do girassol possibilitou ainda o despertar do interesse para a indústria química. Os metabólitos com potencial biológico presentes em seus tecidos ampliaram as possibilidades de uso da planta, a partir de estudos que demonstraram o potencial alelopático de extratos de girassol. Trabalhos como o conduzido por Oracz et al. (2007), constataram o efeito fitotóxico de extratos de folhas de girassol sobre a germinação de mostarda, quando estas folhas foram coletadas na época do florescimento. Do mesmo modo, Macías et al. (1999) encontraram e isolaram compostos aleloquímicos de folhas secas de girassol, via extração com diclorometano, sendo alguns deles fitotóxicos e outros estimulantes. Os autores encontraram, por exemplo, os compostos lactonas sesquiterpênicas, que apresentaram perfil inibitório sobre *Lactuca sativa* cv.

Romano. Ainda, recuperaram o composto Annuinone D, que apresentou perfil estimulante de raiz de *Allium cepa*. Já no trabalho de Kaya et al. (2013), estes testaram extratos de diferentes partes da planta de girassol e verificaram que a germinação e o crescimento das espécies testadas eram influenciados pelas doses de extrato. Adicionalmente, pesquisas demonstram que diferentes cultivares de girassol possuem uma gama de metabólitos secundários, sendo alguns deles com potencial antioxidante (JABRAN, 2017). Em análise comparativa entre espécimes da família *Asteracea*, Sytar et al. (2018) encontraram maiores teores de fenólicos totais e flavonoides no extrato metanólico de folhas de representantes do gênero *Helianthus*.

Em relação a nutrição mineral, assim como as demais plantas, o girassol necessita de macro e micronutrientes para completar seu ciclo de vida. No entanto, a cultura é considerada exigente pelo elemento B (SOUZA et al., 2004). Diversos trabalhos demonstram que o elemento pode influenciar de forma negativa ou benéfica a produção de grãos e óleo de girassol, dependendo da dose aplicada (ALVES et al., 2017; KRUDNAK et al. 2013; TAHIR et al. 2013). Este tipo de evidência torna plausível considerar que diferentes genótipos de girassol podem responder de forma distinta em relação a sua exigência nutricional, mesmo quando cultivados nas mesmas condições ambientais e nutricionais (IVANOFF et al., 2010).

Deste modo, estudos sobre o fornecimento adequado do micronutriente boro são importantes para potencializar seu cultivo, tendo em vista os distintos genótipos de girassol e o efeito da carga nutricional diferenciada deste nutriente sobre a produtividade e potencial biológico de sua cultura.

2.2 O micronutriente boro (B)

O elemento boro (B) é um dos micronutrientes essenciais para o ciclo de vida das plantas. Ele se encontra disponível aos vegetais na forma de ácido bórico (em condições de pH neutro) ou, em solos alcalinos, como ânion borato (DECHEN; NATCHTIGALL, 2006). A absorção do B pode ocorrer através de três mecanismos distintos: por difusão passiva quando a disponibilidade do nutriente está adequada ou elevada, por canais de membrana não-seletivos (NIPs), ou por transportadores de alta afinidade (BOR1). Os dois últimos são ativados em resposta a baixa disponibilidade de B (Figura 4).

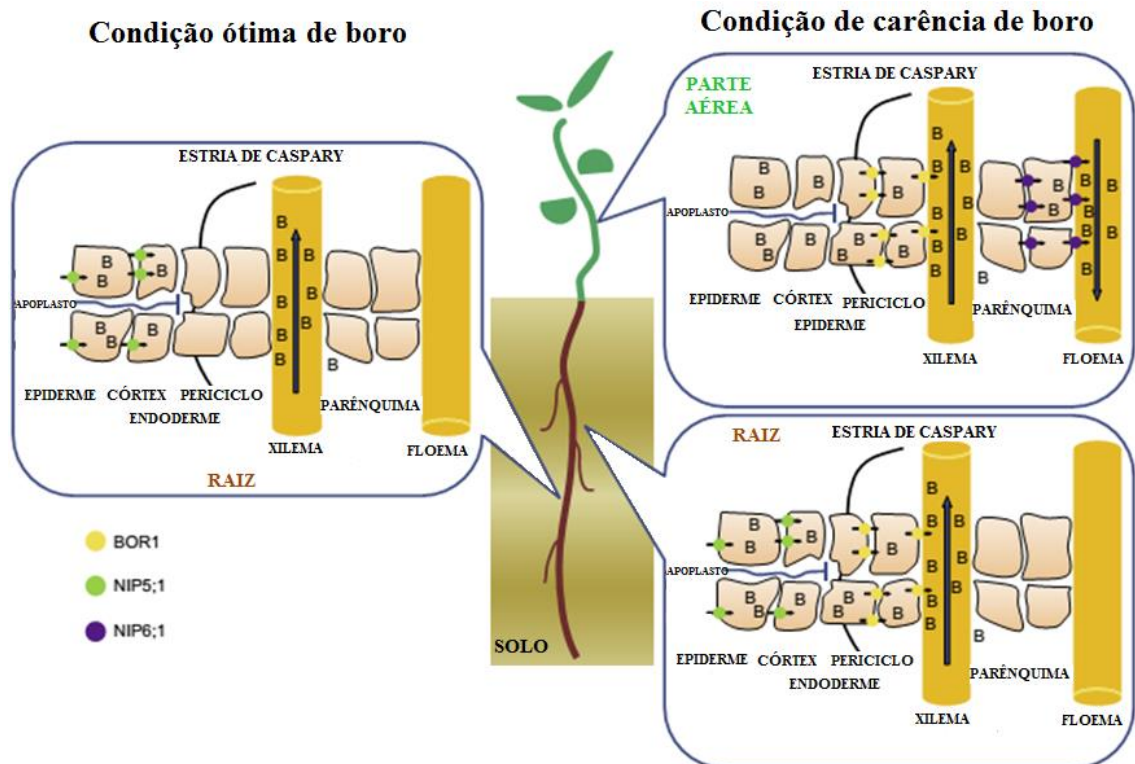


Figura 4 Esquema simplificado do transporte de B através dos canais NIP5;1 e NIP6;1 e do transportador BOR1 presentes nas plantas em condições de abundantes ou escassas do nutriente (adaptado de PRINCI et al., 2015).

Após sua absorção pelo sistema radicular, o B é transportado à longa distância através do xilema. Este fato pode ser observado no experimento realizado por Nachiangmai et al. (2004) que constataram maior concentração do nutriente nas espigas de plantas de trigo. Esta característica foi atribuída à capacidade que este genótipo possui de transportar o B a longas distâncias, devido à transpiração foliar. Alves et al. (2017) analisaram as concentrações de B em todos os compartimentos de plantas de girassol e observaram maiores valores do elemento nos limbos, seguidos dos capítulos em diferentes genótipos. Estes atribuíram esse fato ao transporte à longa distância, das raízes até o capítulo, pela exigência nutricional do desenvolvimento do tubo polínico.

O elemento B é um micronutriente que afeta diversos processos metabólicos nos vegetais, tais como: transporte de açúcares, síntese da parede celular, manutenção da integridade da membrana celular, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo do ácido indolacético, ciclo glutatona ascorbato, metabolismo de substâncias fenólicas, formação do tubo polínico, metabolismo de nitrogênio, fotossíntese e na atividade das enzimas (PRINCI et al., 2015). De acordo com Power; Woods (1997), o B é necessário

para manter a integridade da estrutura da parede celular de células de eudicotiledôneas, pois atua na sua biossíntese, auxiliando o cálcio na deposição e formação dos pectatos presentes na parede. Krudnak et al. (2013) ao analisarem plantas de girassol adubadas com diferentes doses de B observaram que a adubação borácica tem forte influência na viabilidade do pólen e das sementes de girassol. Estes constataram que a viabilidade do pólen diminuiu na maior dose de B (12,50 kg de B. ha⁻¹). Segundo os autores, esse fato ocorre devido aos efeitos tóxicos do excesso de B nas raízes que pode restringir a absorção de nutrientes e o crescimento das plantas. A deficiência do nutriente também pode afetar diretamente o sistema radicular, inibir o alongamento e crescimento das raízes (GUPTA, 2007). Além disso, pode causar o abortamento do botão floral, e ainda, gerar acúmulo de compostos nitrogenados nas partes mais velhas da planta (DECHEN; NATCHTIGALL, 2006).

O conteúdo de B disponível é um dos fatores relacionados ao rendimento de óleo em girassol. Tahir et al. (2013), trabalhando com plantas de girassol sob adubação borácica, verificaram maiores teores de óleo e rendimento de aquênios quando aplicada a maior dose de B. No entanto, apesar do B melhorar a produção de óleo nos girassóis, existe uma linha tênue entre a dose adequada do nutriente e a toxicidade causada por ele em diferentes culturas. Deste modo, é preciso cautela ao aplicá-lo, evitando assim danos à cultura.

Vários estudos relatam a interferência do B no processo fotossintético. Este elemento causa redução da razão F_v / F_m em algumas espécies (F_m = fluorescência máxima e F_v = diferença entre F_m e a fluorescência inicial), ocasionando o fenômeno da fotoinibição que desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PRINCI et al., 2015). Cervilla et al. (2007) analisaram os efeitos causados por doses elevadas de B em plantas de tomate. Dentre os aspectos observados, foram constatados danos oxidativos em folhas de tomate e aumento na produção de enzimas antioxidantes. Varshney et al. (2015), estudaram o efeito da adubação borácica em diferentes genótipos de mostarda, e observaram que doses acima de 20 mg.kg⁻¹ de B diminuíram a capacidade fotossintética e induziram a síntese de metabólitos e enzimas antioxidantes nas plantas. As enzimas peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), importante mecanismo de defesa contra as EROs, têm sido alvo de vários estudos relacionados a aplicação excessiva de B (HOSSAIN et al., 2015, VARSHNEY et al. 2015; CERVILLA et al., 2007; KARABAL et al., 2003). Seth; Aery (2017) observaram a influência de doses

diferenciadas de B sobre o cultivo de trigo (variedade 'Raj 4037'), e observaram que o excesso do micronutriente afetou e alterou os constituintes bioquímicos (substâncias fenólicas, açúcares solúveis, conteúdo de prolina, proteína foliar) e atividades enzimáticas (peroxidase e nitrato redutase).

Diversos autores têm demonstrado o efeito benéfico da aplicação de B em determinados genótipos de girassol. Alves et al. (2017), ao analisarem diferentes genótipos de girassol com e sem adubação borácica constataram que estes apresentavam melhor produção de grãos e óleo na presença do micronutriente. Ainda, segundo os autores, o fornecimento deste em condições de baixa adubação nitrogenada foi fundamental para o melhor rendimento para um dos genótipos, em ambos os parâmetros. Mehmood et al. (2018) também observaram a influência do boro nos teores de óleo e proteína nos grãos, os quais foram melhores quando aplicado o micronutriente comparado com o controle sem B. Shekhawat; Shivay (2008) relataram que a aplicação de boro melhorou a qualidade do óleo, resultando no aumento da quantidade de ácidos graxos insaturados e diminuição de ácidos graxos saturados.

Apesar dos benefícios que a aplicação do B pode trazer, o excesso deste elemento pode causar distúrbios nutricionais nas plantas afetando assim processos essenciais para seu desenvolvimento. Portanto, estudos sobre o fornecimento adequado de doses de B, épocas de aplicação, influência sobre genótipos e efeitos deste sobre a produtividade são necessários para potencializar seu cultivo.

2.3. Capacidade antioxidante e substâncias fenólicas

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes. A formação de radicais livres acontece principalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, sendo os íons ferro e cobre catalisadores desse mecanismo (BARBOSA et al., 2010). A principal fonte destes radicais é a mitocôndria. Através da cadeia transportadora de elétrons o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, formando H_2O . Esta reação é catalisada pela citocromo oxidase, que oxida quatro moléculas de citocromo c e remove um elétron de cada uma delas que são adicionados ao O_2 formando H_2O . A enzima citocromo oxidase faz o controle da formação de radicais livres, para que não ocorra geração em excesso. Entretanto, de 2 a 5% do O_2 metabolizado na mitocôndria é desviado para outras vias, formando os radicais livres (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo provoca vários danos às células e tem sido relacionado a doenças do sistema imune, neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes entre outras (UTTARA et al. 2009). Em defesa a este estresse temos o sistema antioxidante, o qual pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. O enzimático inclui a SOD, a CAT e a GPx. No sistema não-enzimático, que é composto majoritariamente por substâncias antioxidantes, destacam-se as vitaminas, os minerais e os compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010).

Os vegetais produzem diversos metabólitos especiais que possuem em sua estrutura um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Tais substâncias são classificadas como substâncias fenólicas, como por exemplo, derivados dos ácidos benzoicos, cinâmicos e flavonoides. Duas rotas de biossíntese têm destaque na produção destas substâncias: via do ácido chiquímico (Figura 5), envolvida na biossíntese da maioria dos fenólicos nas plantas; e via do ácido malônico, importante para fungos e bactérias e menos expressiva para os vegetais superiores (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos, produzidos pelo metabolismo secundário estão amplamente distribuídos entre os vegetais e são conhecidos pela sua característica antioxidante (GIADA, 2013). Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. As substâncias fenólicas têm demonstrado estarem associadas à ação antioxidante em sistemas biológicos, atuando como sequestradores de oxigênio singlete e radicais livres (SHETTY; MCCUE, 2003). A capacidade antioxidante dessas substâncias depende em grande parte da sua estrutura química. Dentre esses tipos de fenólicos que possuem atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides, taninos, chalconas, cumarinas e os ácidos fenólicos (GIADA, 2013). Os grupos de interesse para este estudo são os ácidos fenólicos, caracterizados por terem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e /ou metoxila na molécula.

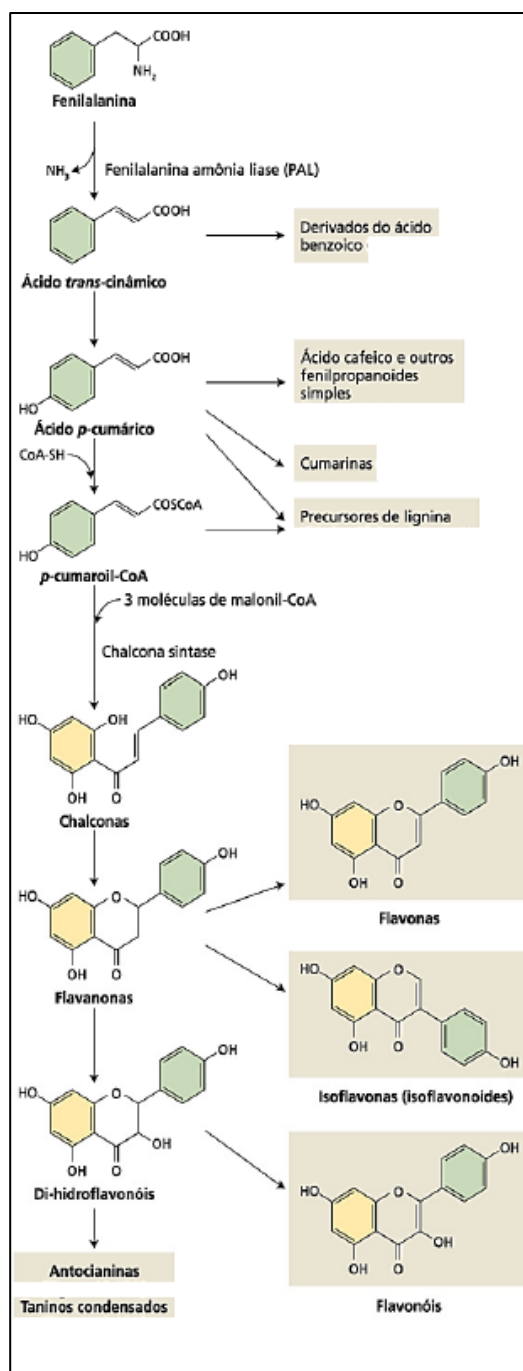


Figura 5 Esquema simplificado da biossíntese de substâncias fenólicas a partir da fenilalanina (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os ácidos fenólicos são substâncias fenólicas divididos em dois grupos: derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos. Alguns exemplos de ácidos cinâmicos comuns na natureza são os ácidos *para*-cúmarico, ferúlico, cafeico e sináptico, existentes nos vegetais, ou também encontrados na forma de ésteres, como o ácido clorogênico, um éster do ácido cafeico e do ácido quínico (Figura 6A). Segundo Carrão-Panizzi; Mandarino

(1994), o ácido clorogênico constitui cerca de 70% do total de substâncias fenólicas do farelo do girassol. Entre a classe dos derivados do ácido benzóico destacam-se os ácidos protocatecuico, gálico, vanílico, siríntrico, gentísico, salicílico e elágico (Figura 6B). Estes possuem um grupo carboxílico ligado ao anel aromático (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

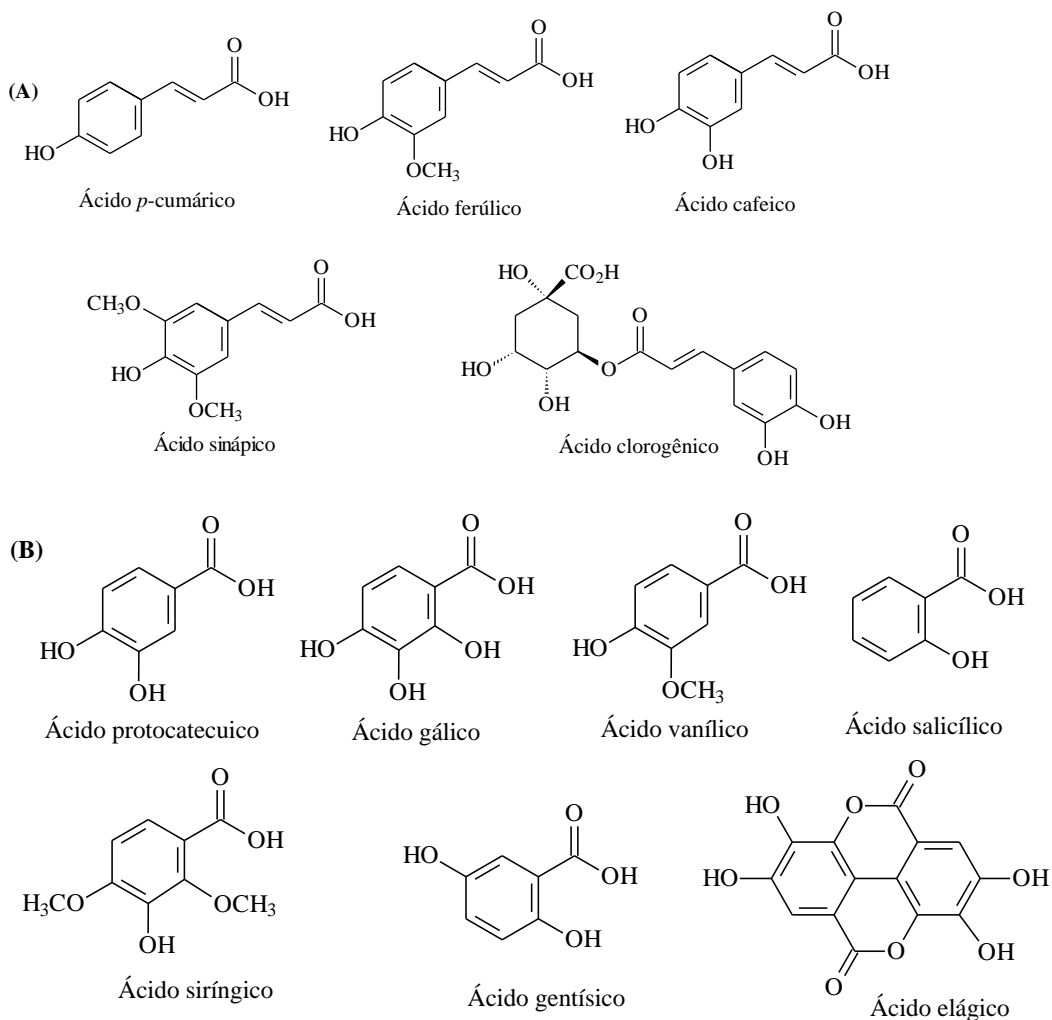


Figura 6 Estruturas químicas: derivados do ácido cinâmico (A), derivados do ácido benzóico (B).

As substâncias fenólicas podem atuar de várias formas: combate os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição (exemplo: Fe^{2+} e Cu^+); descontinuando a reação de

propagação dos radicais livres na oxidação lipídica e alterando o potencial redox do meio (SUCUPIRA et al., 2012).

Pesquisas demonstram que diferentes cultivares de girassol possuem uma gama de metabólitos secundários, sendo alguns deles com potencial antioxidante (JABRAN, 2017). Em análise comparativa entre espécimes da família *Asteracea*, Sytar et al. (2018) encontraram maiores teores de fenólicos totais e flavonoides no extrato metanólico de folhas de representantes do gênero *Helianthus*. Pajazk et al. (2014) constataram que durante a germinação há um aumento dos níveis de fenólicos e, conseqüentemente ocorrer um aumento da atividade antioxidante das sementes. Giada; Mancini-Filho (2009) verificaram a capacidade antioxidante de extratos dos cotilédones das sementes de girassol *in vitro*. Neste experimento, os autores observaram a alta capacidade antioxidante do extrato aquoso. No entanto, os ensaios *in vitro* para testes de capacidade antioxidante de substâncias não simulam as condições fisiológicas e não consideram fatores metabólicos como biodisponibilidade e transformações enzimáticas. Uma alternativa para esta questão são os testes *in vivo*, utilizando um modelo biológico como *Saccharomyces cerevisiae*, que são organismos eucarióticos unicelulares que possuem grande semelhança com células de mamíferos (macromoléculas, estruturas, organelas), o que as tornam importantes para o estudo do estresse oxidativo (PRUDÊNCIO, 2016). Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da capacidade antioxidante de inúmeras substâncias de forma rápida e reprodutível, e os resultados obtidos podem ser mais facilmente correlacionados ao observado no homem, do que aqueles obtidos em ensaios químicos (SOARES et al., 2005).

Fatores abióticos, como a disponibilidade de nutrientes, podem causar estresse oxidativo às plantas, acarretando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (PRINCI et al. 2015). Estudos demonstraram que plantas tratadas com excesso de B têm seu sistema fotossintético afetado e conseqüentemente o sistema antioxidante. Varshney et al., 2015 ao avaliarem variedades de mostarda cultivadas com doses crescentes de B, observaram uma queda na taxa fotossintética líquida e nos parâmetros relacionados (clorofila, valor SPAD e as enzimas anidrase carbônica e nitrato redutase) e aumento do nível de enzimas antioxidantes (catalase, peroxidase e superóxido dismutase). Landi et al. (2013), trabalhando com plantas de abobrinha e pepino observaram um estímulo ao

sistema antioxidante de ambas culturas quando tratadas com excesso de B. Eles constataram um aumento da atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase). Portanto, este trabalho de tese testa a hipótese de que plantas cultivadas com diferentes doses de B e, conseqüentemente, submetidas ao estresse oxidativo causado por este elemento, devem apresentar como resposta o aumento no conteúdo de compostos antioxidantes. Assim, os extratos produzidos a partir dessas plantas devem possuir quantidade considerável de compostos que exibam capacidade antioxidante e com potencial alelopático.

O estudo das propriedades antioxidantes de substâncias fenólicas presentes nos vegetais é de interesse para a área da saúde, já que seus efeitos ajudam na prevenção de doenças. Segundo Lampe (1999) os danos causados pelo estresse oxidativo, o qual gera um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e as defesas antioxidantes, podem ser peças fundamentais em doenças cardiovasculares, início do câncer, formação de cataratas, processo de envelhecimento, doenças inflamatórias entre outros.

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para obter a distinção, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante das substâncias, tanto através de testes químicos (*in vitro*) ou utilizando culturas celulares (testes biológicos). Os testes químicos são mais simples e rápidos de serem executados, entretanto, não são representativos das condições celulares do homem. Ensaio biológico *in vivo* utilizando-se, principalmente, células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm se mostrado útil para determinação da capacidade antioxidante de diferentes substâncias em matrizes vegetais, fornecendo resultados rápidos e passíveis de serem correlacionados ao observado no homem.

Há possíveis aplicações também para a indústria de alimentos, por exemplo, com possibilidade de desenvolvimento de alimentos funcionais. Além disso, há aplicações potenciais na indústria de cosméticos, com o desenvolvimento de formulações com propriedades antioxidantes (produtos comercialmente conhecidos como anti-idade ou “rejuvenescedores”).

2.4 Alelopatia

O estudo da alelopatia tem sido bastante utilizado na agricultura, pois os metabólitos secundários presentes em fungos, microorganismos e plantas podem interferir em sistemas biológicos ou agrícolas, estimulando-os ou inibindo-os (FAROOQ

et al., 2011). No campo, a alelopatia pode ser empregada para o controle de pragas e plantas daninhas quando utilizada em sistema de rotação de culturas. Os compostos fenólicos fazem parte do amplo grupo dos aleloquímicos, de acordo com o seu grau de complexidade encontramos derivados benzoicos e cinâmicos simples, flavonoides, polifenóis e, recentemente, depsídeos, depsidonas e outros compostos aromáticos de origem liquênica (MACIAS et al 2007). Alguns estudos revelam que o girassol pode ser utilizado para este fim. Isto porque os extratos obtidos de partes de plantas de girassol possuem um efeito fitotóxico sobre a germinação e crescimento de algumas espécies de plantas (KAYA et al., 2013; NIKNESHAN et al. 2011; FAROOQ et al. 2011). Kaya et al. (2013) estudaram o efeito de extratos de caule e capítulo de girassol sobre a germinação de trigo, cevada, lentilha e no próprio girassol, a fim de estudar os efeitos do girassol na rotação de culturas. Eles observaram um maior efeito fitotóxico no extrato do capítulo das plantas, o qual os autores atribuíram principalmente à substância α -pineno presente no óleo essencial das plantas. Rigon et al., 2018 avaliaram o extrato aquoso de diferentes órgãos de três genótipos de girassol, coletados no florescimento, sobre a germinação de rabanete e constataram diferenças no potencial alelopático entre órgãos da planta (ordem de raiz, caule e folha), e entre genótipos. Muhammad e Majeed (2014) compararam o efeito de extratos de diferentes partes de plantas de girassol, elaborados a partir de material seco e fresco, sobre a germinação de trigo e milho. Em ambos os casos, o maior efeito alelopático foi com o extrato obtido de material seco das folhas.

Segundo dados da literatura os aleloquímicos presentes no girassol têm potencial para serem utilizados no controle de plantas invasoras (ANJUM; BAJWA, 2007). Mercali et al. (2012) encontraram diferentes metabólitos secundários através do estudo fitoquímico dos extratos alcoólicos e aquosos de brotos de girassol. Neste estudo, foi constatado que no extrato alcoólico havia presença de cumarinas, esteróis e triterpenos, enquanto no extrato aquoso havia taninos, catequinas e aminogrupos.

Macías et al. (1999) testaram aleloquímicos isolados de extratos de folhas de *Helianthus annuus* sobre a germinação e crescimento das sementes de *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicon esculentum* (dicotiledôneas), *Hordeum vulgare* e *Triticum estivum* (monocotiledôneas). Algumas das substâncias testadas apresentaram efeito inibitório, enquanto outras apresentaram efeitos estimulantes sobre a germinação e o crescimento das plantas, no entanto, todas apresentaram algum efeito alelopático.

A produção de alguns metabólitos secundários está relacionada ao mecanismo de defesa das plantas contra patógenos. Estes estimulam a produção de algumas enzimas, como, por exemplo, a fenilalanina amônia-liase (PAL), que está envolvida na síntese dos fenilpropanoides. A expressão gênica da proteína PAL é responsiva às tensões ambientais, incluindo infecções patogênicas, fermento, esgotamento de nutrientes, irradiação UV, e temperaturas extremas (KIM; HWANG, 2014). A infecção por fungos induz a transcrição do RNAm, que codifica para essa enzima e resulta em alterações na produção de substâncias fenólicas (JONES, 1984). Prats et al. (2007) verificaram a presença de substâncias fenólicas em extratos da corola de girassol (por exemplo, cumarinas) produzidas pelo mecanismo de defesa das plantas ao ataque de fungos, tais substâncias conferiram resistência na cultura contra o fungo *Sclerotinia*. Em trabalho anterior, Prats et al. (2003) relacionaram a resistência ao fungo à produção de substâncias fenólicas e atividade da PAL em diferentes genótipos de girassol. Eles constataram que o genótipo mais resistente tinha maior teor de fenólicos e maior atividade da enzima.

Os danos causados por fitotoxinas presentes no extrato de girassol, sobre a germinação de outras plantas pode ser devido a ocorrência de um estresse oxidativo nas sementes. Oracz et al. (2007) investigaram esse efeito sobre a germinação de mostarda e observaram que os extratos aquosos de folhas de girassol estimularam o sistema antioxidante, mas não o suficiente para impedir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de danos à membrana celular. Bogatek et al. (2006) analisaram o efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol, também sobre a germinação da mostarda, e constataram danos à permeabilidade da membrana celular. Isto porque obtiveram aumento no extravasamento de eletrólitos e maior peroxidação lipídica. De acordo com Bogatek & Gniazdowska (2007), os aleloquímicos presentes no girassol atuariam como sinalizadores causando um desequilíbrio hormonal entre ácido abscísico (ABA) e o etileno na germinação de sementes de mostarda. Este desbalanço diminuiria a atividade metabólica do embrião inibindo sua germinação e crescimento (Figura 7). Para constatar esta hipótese, os autores determinaram a produção desses hormônios em sementes de mostarda embebidas em fitotoxinas de girassol. Foi observado que a concentração de ABA foi duplicada em comparação com as sementes embebidas em água, e a emissão de etileno por sementes de mostarda foi fortemente reprimida pelo extrato de girassol.

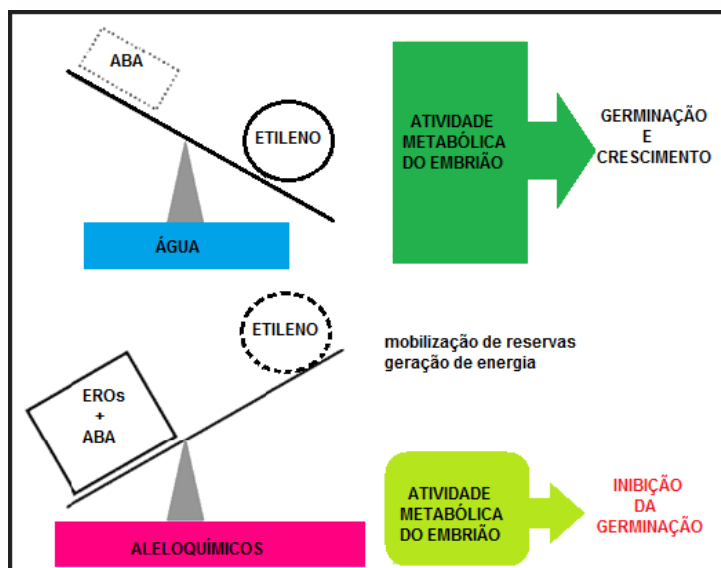


Figura 7 Esquema simplificado do balanço hormonal (ABA e etileno) e de formação de EROs durante a germinação de sementes de mostarda embebidas em água ou no extrato foliar de girassol (adaptado de BOGATEK; GNIAZDOWSKA, 2007).

O controle químico de plantas daninhas oferece uma eficácia aparente, visto que algumas espécies de plantas adquirem certa resistência à defensivos agrícolas. Além disso, a aplicação inadequada de herbicidas pode ocasionar danos à cultura de cultivo e ao meio ambiente. A utilização de controle biológico, através da alelopatia, se apresenta como uma técnica alternativa para este problema. Diferentes metabólitos secundários com característica fitotóxica, podem ser encontrados principalmente nas folhas de girassol.

Agricultores incorporam resíduos culturais no solo como forma de melhorar a fertilidade e a matéria orgânica no mesmo, no entanto é importante verificar o efeito da incorporação dos restos culturais do girassol no crescimento das plantas (BASHIR et al 2012). Os resíduos de plantas de girassol, os quais possuem conhecido potencial alelopático, podem ser utilizados no controle de ervas daninhas em ambientes agrícolas (JABRAN, 2017). As aplicações da alelopatia podem ser uma alternativa para a substituição ou diminuição do uso de herbicidas e, quem sabe uma solução para as regiões agrícolas que enfrentam o problema de ervas daninhas resistentes a determinados agroquímicos. Dentre essas espécies daninhas podemos destacar o capim amargoso (*Digitaria insularis*), com alto grau de infestação e algumas resistentes, presentes em lavouras e pastagens da região centro-oeste do Brasil.

De acordo com Gemelli et al. (2012) é complicado prever uma recomendação única para o manejo do capim amargoso, pois é uma planta perene altamente agressiva, de difícil controle e que se desenvolve praticamente o ano inteiro em função das condições climáticas brasileiras. Segundo esses autores, para se estabelecer as melhores práticas de controle é preciso resultados eficazes de herbicidas sobre a planta em todos os seus estágios de desenvolvimento e épocas do ano. Um herbicida para ser considerado bom tem que ter ação graminicida, sistêmico e ser altamente seletivo. A informação de como os aleloquímicos atuam é importante para a criação de técnicas sustentáveis de manejo na agricultura (ALMEIDA et al., 2008).

Ainda que a propriedade alelopática do girassol já esteja definida, não há estudos mais aprofundados sobre o seu potencial. Os genótipos de girassol podem apresentar potencial alelopático diferenciado (ALSAADAWI et al., 2012), e as culturas também apresentam respostas distintas à aplicação dos extratos entre variedades da mesma espécie (BASHIR et al., 2017). Com o estudo das aplicações alelopáticas dos compostos presentes nas plantas de girassol, nas folhas e demais compartimentos, é possível aumentar o valor da produção da cultura e realizar o controle de espécies daninhas de forma sustentável, podendo até mesmo substituir o uso de herbicidas.

3 OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi avaliar a resposta da produção de grãos, do teor e a qualidade do óleo de girassol com o fornecimento diferencial de boro. E ainda, avaliar o potencial biológico do uso de extratos de folhas e capítulos de girassol em estratégias alelopáticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de doses diferenciadas de boro na produção de grãos e óleo, no teor de proteína bruta e no perfil de ácidos graxos em diferentes genótipos de girassol.
- Determinar o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais em extratos de girassol.
- Realizar estudo da capacidade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos de girassol *in vivo*, utilizando o modelo biológico *Saccharomyces cerevisiae*, e *in vitro*, pelo método de captura de radicais livres (ABTS) e pelo poder de redução do ferro (FRAP).
- Avaliar o perfil químico das substâncias presentes nos extratos aquosos e etanólicos de girassol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).
- Avaliar o potencial alelopático de extratos de capítulo e folha de girassol sobre a germinação de *Digitaria insularis*.

4 HIPÓTESES

Diferentes condições de cultivo com a adição de boro influenciam o metabolismo do girassol (*Helianthus annuus* L.), afetando a produção de grãos, a qualidade do óleo e os metabólitos da planta, levando a alterações no seu rendimento e qualidade. Estudos anteriores têm demonstrado a influência do boro em mecanismos antioxidantes das plantas, em consequência, doses diferenciais desse elemento podem influenciar a capacidade antioxidante dos extratos de seus tecidos. Nesse sentido, o extrato dos tecidos de partes da planta de girassol deve apresentar potencial alelopático e capacidade antioxidante.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Produção de Grãos, Teor e Qualidade do Óleo de Três Genótipos de Girassol Sob Diferentes Doses de Boro

5.1.1 Área e condução do experimento

O experimento foi realizado na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, localizada no município de Dourados-MS (54° 56' W e 22° 12' S). O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho distroférico muito argiloso. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3x4 sendo três genótipos de girassol (BRS323, BRS324 e Helio251) e quatro doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹), sendo o ácido bórico a fonte de B, com quatro repetições totalizando 48 parcelas. Cada parcela foi composta por seis linhas de 6 m de comprimento cada, espaçamento de 0,70 m entre linha e 0,30 m entre plantas na linha. Como área útil foram utilizadas as duas linhas centrais, sendo eliminada, a título de bordadura, 1 m de cada extremidade.

A semeadura do girassol foi realizada manualmente em 21 de janeiro de 2016. A adubação de boro foi realizada após a semeadura com pulverizador costal pressurizado (CO₂), equipado com barra de três metros e seis bicos de aplicação XR Teejet 110.02 VS, espaçados 0,50 m (Figura 8A). O volume de calda aplicado foi de 80 L. ha⁻¹. Após 10 dias da emergência, quando as plantas estavam no estágio V2, realizou-se o desbaste, ajustando-se para as populações de 45.000 plantas. ha⁻¹ (Figura 8B). Por ocasião da semeadura foram aplicados, em todas parcelas, 300 kg do formulado 8-20-20 no sulco de plantio. Aos 25 dias após a emergência foi feita a adubação de cobertura com 26 kg.ha⁻¹ de N utilizando ureia como fonte. A adubação foi determinada de acordo com a análise química do solo (Tabela 1). Consideram-se como os valores críticos de boro para o girassol os teores de 0,4 mg/dm³ no solo (GAZZOLA et al., 2012). Para controle de plantas daninhas foram realizadas capinas manuais aos 15 e aos 30 dias após a emergência (DAE).

Foram realizadas duas coletas, uma na fase reprodutiva R5 (Figura 8C) e outra no final do ciclo, na maturação dos grãos, fase R9 (Figura 8D). Na primeira coleta foi avaliado apenas o teor de B nos capítulos. Foi priorizado este estágio de florescimento, pois durante esta fase a deficiência do elemento B pode ocasionar a deformação do tubo polínico, prejudicando a fertilização e conseqüentemente a produção de grãos (CALLEMANZANO, 1985). Na segunda coleta foram avaliados os teores de B nos capítulos e

grãos, a produtividade de grãos, os teores de proteína e de óleo nos grãos, e o perfil de ácidos graxos. A determinação dos teores de B nos capítulos e grãos foi realizada pelo método colorimétrico com o reagente azometina – H (MALAVOLTA et al., 1997).

Tabela 1 Análise química de amostras compostas de solo (0-20 cm e 20-40 cm de profundidade), coletadas na área experimental na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, município de Dourados-MS.

Identificação	pH	MO	Al ⁺⁺⁺	H ⁺ + Al ⁺⁺⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺
Amostra	CaCl ₂	g dm ⁻³	mmol dm ⁻³				
0-20	5,6	30	0	34	3,33	67	22
20-40	5,1	26	0	43	1,69	36	14

Identificação	P	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B
Amostra	mg dm ⁻³						
0-20	35	3	6	2,7	10,6	0,3	0,28
20-40	17	39	5	1,9	5,4	0,1	0,22



Figura 8 Cultivo dos genótipos de girassol (BRS324, BRS323 e Helio251) com diferentes doses de boro na área experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). **A-** Aplicação dos tratamentos com B (0; 2,5; 5 e 8 kg. ha⁻¹); **B-** 10

DAE (estágio V2), realização do desbaste; **C**- plantas no estágio R5, primeira coleta; **D**- Plantas no final do ciclo (estágio R9), segunda coleta.

5.1.2 Determinação de B no material vegetal

A determinação dos teores de B no material vegetal foi realizada de acordo com MALAVOLTA et al. (1997). Para a realização das análises foram pesados cerca de 500mg de amostra. Esta quantia foi transferida para cadinhos de cerâmica e incineradas em mufla a 550°C, até a obtenção de cinza branca. Após a queima do material, a cinza foi dissolvida com 10 mL HCl (0,1N) e, posteriormente, a solução foi colocada em repouso. Foi realizada a análise colorimétrica, onde foram transferidos para tubos de ensaio 1mL de amostra, 1 mL de solução tampão (500 g de acetato de amônio e 30 g EDTA-2Na dissolvidos em 800mL de H₂O deionizada, e 250 mL de ácido acético glacial) e 1 mL de solução de azometina H 0,45%. Depois de meia hora foram pipetados 250 µL desta solução em poços de microplaca. As leituras foram realizadas na leitora de microplacas (Thermo Scientific) a 420 nm. O ácido bórico foi utilizado para a confecção da curva analítica padrão, nas concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 ppm de boro.

5.1.3 Determinação do teor de proteína bruta

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl, conforme descrito por Tedesco *et al.* (1995) (Figura 9). Esta medição é utilizada para determinar o teor de nitrogênio no grão, e os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de correção 6,25 (ALVES et al., 2012).

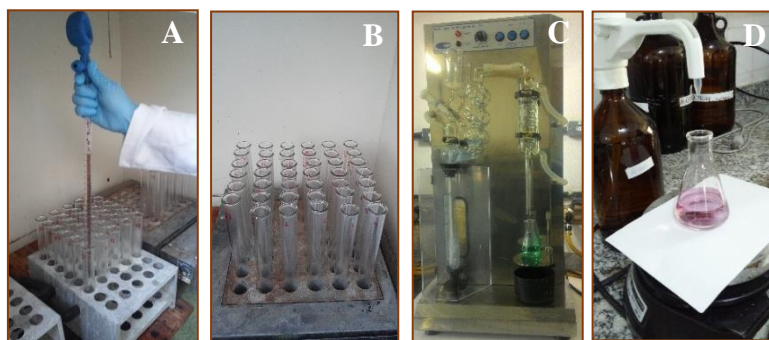


Figura 9 A e B - digestão sulfúrica das amostras de grãos trituradas, dentro da capela de exaustão; C- destilação por arraste a vapor; D- titulação das amostras.

5.1.4 Extração do óleo

Antes de realizar a extração do óleo, as sementes de girassol foram secas em estufa de circulação de ar à 50° C até peso constante, e em seguida foram trituradas em moinho analítico (IKA®A11 basic). Cerca de 5g do material triturado foi colocado em um cartucho de papel filtro dentro de um extrator de Soxhlet, e extraído com 250 mL de *n*-hexano por 4h, para a realização de cerca de 72 ciclos para a extração completa do óleo. O extrato hexânico recolhido em balão foi concentrado em um evaporador rotativo (IKA®RV 10 control) por 20 minutos com rotação de 100 rpm em banho-maria à 60 °C (Figura 10). Após completa evaporação do solvente o óleo obtido foi pesado e armazenado em frasco apropriado.

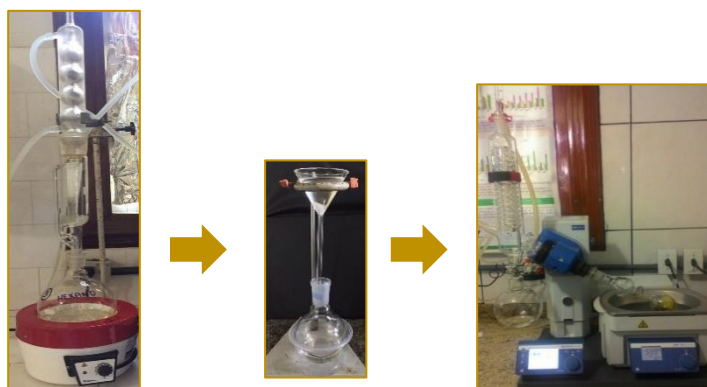


Figura 10 Procedimento de extração do óleo no extrator de Soxhlet, filtração do solvente e evaporação do solvente em rota evaporador.

5.1.5 Análise do perfil do óleo por cromatografia em fase gasosa

Cerca de 15 mg do material lipídico foram pesados e em seguida submetidas ao processo de metilação, onde foram adicionadas 0,4 mL de uma solução 0,5 N de hidróxido de sódio em metanol. Em seguida, os frascos foram colocados em banho-maria à 100 °C durante 10 minutos. Com a solução ainda quente foram adicionados 0,5 mL de BF₃-metanol e as amostras retornaram ao banho-maria por mais 2 minutos a 100 °C. Após esfriar a temperatura ambiente, as soluções obtidas foram particionadas com 2,0 mL de éter de petróleo. Após a agitação do frasco por 1 minuto para favorecer a separação das fases, a solução foi deixada em repouso durante 30 minutos. Em seguida a fase aquosa foi descartada, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada para frasco âmbar. As amostras foram mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento

da análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (METCALFE et al., 1966 modificado).

A análise dos ésteres metílicos foi realizada através das injeções das amostras e do padrão FAME (1 μ L) em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM; GC-17A/QP2010 Plus-Shimadzu). Para análise dos ésteres metílicos foi utilizada coluna capilar 5% fenilmetilpolisiloxano HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m, Agilent) com programação de temperatura de 130 °C, por 1 minuto, seguida de taxa de aquecimento de 3 °C min^{-1} até 270 °C onde permaneceu durante 10 minutos. A injeção foi realizada no modo *split* (1:30), tendo hélio como gás de arraste, injetor mantido a temperatura de 240 °C, interface de 310 °C, fonte de íons a 250 °C e energia de impacto de 70 eV. Os espectros de massas foram analisados na faixa de varredura de 40-500 u.m.a. Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas com os dados das bibliotecas NIST 6.2, NIST 1.2 e com o Padrão FAME MIX C4-C24 (Sigma-Aldrich®) injetado nas mesmas condições.

5.1.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade de variâncias (Breuch Pagan), utilizando-se o pacote lmtest. Posteriormente, os resultados foram submetidos a análise de variância usando o teste F, e quando houve efeito significativo para as variáveis quantitativas foi ajustado modelo de regressão quadrática. No caso de interação significativa entre genótipo e dose, foi utilizado o teste de Tukey para comparação das médias, utilizando-se do pacote ExpDes.pt. Todas as análises foram realizadas no software R 3.3.0.

5.2 Capacidade Antioxidante de Extratos de Girassol

5.2.1 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos foi conduzido um experimento de campo na fazenda experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, município de Dourados-MS. Durante a fase R5 foram coletadas folhas do genótipo de girassol Helio251, cultivado sob diferentes doses de B (0, 2,5 e 8 kg. ha^{-1}), e de capítulos de plantas cultivadas na dose de 2,5 kg. ha^{-1} de B.

Os extratos foram preparados com folhas secas do genótipo de girassol Helio251. Os extratos aquosos foram preparados pelo método de decocção e os etanólicos com o aparelho de ultrassom.

Decocção

Foram pesados cinco gramas de material vegetal seco e triturado, e adicionados a um béquer com 50 ml de água destilada estéril à 80 °C. Após 15 min em banho-maria, o material foi filtrado e congelado em freezer à -80 °C. Todo procedimento foi realizado dentro de uma cabine de segurança para garantir a esterilidade do material. Em seguida, as amostras foram congeladas e liofilizadas.

Extração em Sonicador Ultrassônico

Foram pesados cinco gramas de material vegetal seco e triturado, e adicionados a um erlenmyer com 50 mL de etanol absoluto. O extrato foi obtido por extração em aparelho Sonicador Ultrassônico (Ultronique, modelo QR500) com *probe* de imersão com três pulsos de quinze minutos e potência de 90 W. Em seguida, os extratos foram filtrados e concentrados em aparelho rota evaporador.

Para as determinações químicas das substâncias presentes no extrato etanólico, a extração em Sonicador Ultrassônico foi realizada com solvente etanol 80%, com posterior retirada dos pigmentos que interferem nas leituras das absorvâncias através de partição com clorofórmio. Em seguida o solvente foi evaporado no rota evaporador.

5.2.2 Determinação de fenólicos totais

A determinação da concentração de fenólicos totais nos extratos foi feita com base no uso de uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido gálico, utilizando o método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Salgueiro & Castro (2016). Uma porção de 50 µL de cada um dos extratos foi transferida para frascos de 5 mL, em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 4% recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 5 minutos em aquecimento em banho a 50 °C, onde se observou a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Após esse tempo, fez-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis a

760 nm utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água ultrapura como branco. O teor de fenólicos totais nos extratos foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100mg de extrato.

5.2.3 Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado com o reagente cloreto de alumínio (MEDA et al., 2005; AHN et al., 2007). Os extratos foram diluídos em metanol grau espectroscópico. A partir desse extrato, foi realizada a análise colorimétrica, onde foram transferidos 400 µL de amostra, 200 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio 2% para o balão volumétrico de 10 ml, e completado o volume com metanol. Após 30 minutos em repouso, as soluções foram lidas a 415 nm. Neste caso, apenas o metanol foi utilizado como branco. A quercetina foi utilizada para a confecção da curva analítica padrão, onde foi preparada uma solução padrão de quercetina em metanol (1,78 mg/mL \equiv 0,0059 mM). Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µL desta solução padrão e solução metanólica de cloreto de alumínio 2% para completar o balão volumétrico de 10 ml, portanto, a curva analítica foi confeccionada nas seguintes concentrações: 50, 40, 30, 20, 10, 15, 5 e 1 µg mL⁻¹. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando metanol como branco. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes em quercetina por 100 g de extrato (mgE_Q/100g), com três repetições para cada análise.

5.2.4 Testes químicos para a capacidade antioxidante

Captura do radical-cátion (ABTS^{•+})

A avaliação da capacidade antioxidante pela captura do radical-cátion (ABTS^{•+}) foi realizado segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007), na qual esta capacidade é medida através da captura do radical-cátion ABTS^{•+}. Para a obtenção da solução do radical-cátion ABTS^{•+} é realizada uma reação a partir de 5 mL da solução de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM). Esta solução é mantida no escuro por 16 horas em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da solução

foi diluída com etanol até alcançar a absorvância de $0,700 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ com leitura realizada no comprimento de onda de 734 nm . Foram adicionados $50 \mu\text{L}$ da amostra e 5 mL do reagente ABTS em tubos de ensaio. Após 6 minutos , as leituras das amostras foram realizadas a 734 nm , e o etanol foi utilizado como branco. Uma solução etanólica de Trolox foi utilizada para a confecção da curva analítica nas concentrações de $0,0$; $0,3$; $0,6$; $0,9$; $1,2$; $1,5$; $1,8$; $2,1$ e $2,4 \text{ mmol/L}$. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de Trolox por 100 g de extrato.

Redução do íon ferro (FRAP)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertonecelj et al. (2007). Para a obtenção do reagente FRAP adicionou-se 25 mL de tampão acetato de sódio ($0,3 \text{ M}$; $\text{pH } 3,6$) + $2,5 \text{ mL}$ de uma solução de 40 mM de HCl de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à 10 mM + $2,5 \text{ mL}$ de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM . Em tubos de ensaio, foram adicionados $0,5 \text{ mL}$ de amostra e em seguida $4,5 \text{ mL}$ de reagente de FRAP. A mistura foi mantida aquecida a 37°C por 10 minutos , onde a coloração da solução passou de azul claro para azul escuro. A leitura das amostras foi realizada a 593 nm , e o branco composto por solução reacional sem amostra. Uma solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 - $1000 \mu\text{M}$) foi utilizada para o preparo da curva analítica nas concentrações de 100 , 200 , 300 , 400 , 500 , 600 , 700 , 800 , 900 e $1000 \mu\text{M}$. Os resultados foram expressos em valores de FRAP ($\mu\text{mol Fe(II)}/100 \text{ g}$).

5.2.5 Ensaio biológico para capacidade antioxidante

Para os ensaios biológicos foram utilizadas células do modelo eucariótico levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BY4741) em sua primeira fase exponencial, crescidas em meio YPD (extrato de levedura 1% , peptona 2% e glicose 2%). Os tratamentos foram preparados com extratos etanólicos e aquosos de folhas de plantas submetidas a diferentes doses de B no campo ($2,5$ e $8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Para estabelecer os tratamentos e o tempo de ação a serem aplicados nas leveduras, foi realizado um pré-ensaio para testar a toxidez dos extratos. O volume de meio de cultura que correspondente à 20 mg de células foi adicionado a erlenmeyers com meio de cultura YPD. Neste ensaio, os extratos foram acrescentados em diferentes concentrações. Após o tempo de tratamento, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a $40 \mu\text{g}$ de células foram

diluídas em água destilada estéril. Posteriormente, as diluições seriadas foram plaqueadas em meio de cultura YPD sólido. Ao final dos testes, foram determinados os parâmetros para serem utilizados no ensaio biológico. Foram selecionados o tempo de 2 h de exposição ao tratamento, e as concentrações de 0,1 e 0,5% para o extrato aquoso, e 0,01 e 0,025%, para o etanólico.

Para o ensaio de viabilidade celular, células de *S. cerevisiae* durante sua fase exponencial, foram previamente tratadas com extrato aquoso em concentrações de 0,1 e 0,5% e extrato etanólico de 0,025% e 0,050%. Após 2h sob agitação com o tratamento adaptativo, as células foram lavadas com água destilada estéril e centrifugadas a 4.000 rpm por 4 min à 25°C. O precipitado celular foi novamente ressuscitado em meio YPD e as células foram ressuscitadas com o agente estressante H₂O₂ (1 mM) durante 1 h, sob agitação. Após o tempo de incubação as células foram plaqueadas em meio de cultura YPD sólido. Em seguida foram incubadas por 48 h em estufa B.O.D. à temperatura 28 °C para posterior contagem. Todo ensaio foi realizado em triplicata. Foram utilizados como controle negativo as células sem adição de H₂O₂, e como controle positivo as células expostas apenas ao H₂O₂ (Figura 11).

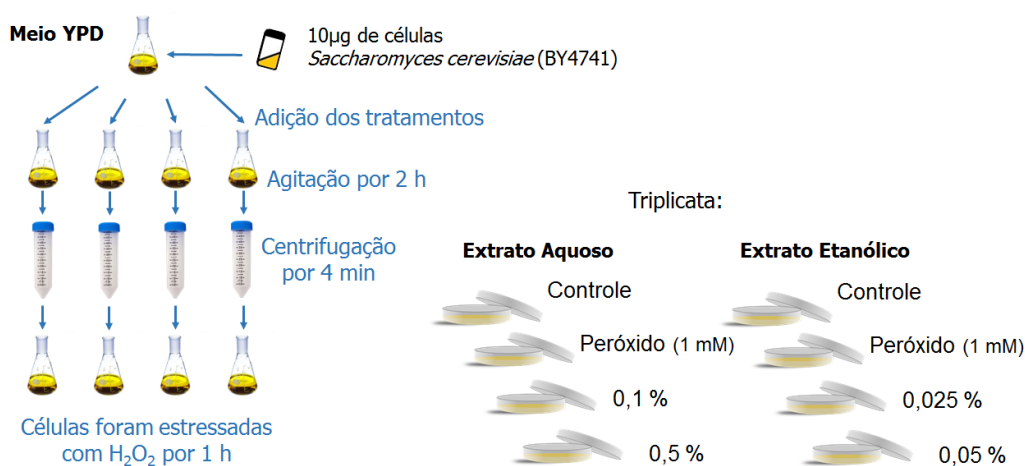


Figura 11 Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* tratadas com extrato aquoso e etanólico de girassol, sob estresse oxidativo.

5.2.6 Análise qualitativa dos extratos por CLAE-DAD

Os perfis cromatográficos dos diferentes extratos de girassol foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD, Shimadzu), constituído por duas

bombas série LC- 20AT, detector de arranjo de díodos série SPD-M20A e autoinjeter SIL-10A. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa Betasil C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Thermo) mantida a 40 °C, com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A fase móvel foi constituída por uma mistura de água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol (100, solvente B), e um gradiente linear foi realizado começando com 10% de metanol até 90% durante 20 min. Todos os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa (13 mm, porosidade de 0.45 µm, PVDF, Analítica) e 20 µL injetados. A identificação das substâncias presentes nos extratos foi baseada na comparação dos tempos de retenção e suas curvas no UV com os de padrões autênticos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido vanílico e ácido siríngico).

5.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando as variáveis diferiram pelo teste F, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

5.3 Potencial Alelopático de Extratos de Folhas e Capítulos de Girassol Sobre a Germinação de *Digitaria insularis*

5.3.1 Condução do experimento

Foram utilizadas amostras de folhas e capítulos coletadas no primeiro experimento para a elaboração do extrato alelopático. Os extratos foram preparados a partir de cinco gramas de material vegetal seco e triturado, através do método de decocção, descrito no item 5.2.1. Sementes de *Lactuca sativa* e *Digitaria insularis* (L.) Fedde foram germinadas em placas de Petri (50 sementes por placa) em um papel de filtro umedecido com água destilada autoclavada (BOGATEK et al., 2006). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial de tratamentos (fonte extrato x dose extrato), composto por quatro repetições.

O potencial alelopático dos extratos foi avaliado através do tempo e da quantidade de sementes germinadas. Além disso, foi avaliado o extravasamento de eletrólitos das sementes e plântulas.

5.3.2 Métodos analíticos

O potencial alelopático foi avaliado através da determinação da porcentagem e do tempo de germinação. Foi adotado como critério para semente germinada àquelas apresentando radículas com 2 mm de comprimento. A avaliação dos resultados foi realizada no primeiro dia em que as plantas começaram a germinar (protrusão da radícula). No sétimo dia foram avaliadas a porcentagem de germinação (contagens) e o extravasamento de eletrólitos.

5.2.3 Índice de velocidade de germinação (IGV)

O índice de velocidade de germinação foi calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação (MAGUIRE, 1962), de acordo com a fórmula:

$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + \dots + (GN/NN)$$

5.3.4 Extravasamento de eletrólitos

O extravasamento de eletrólitos foi mensurado com um medidor de condutividade modelo BEL W12D. Foram utilizadas 20 sementes ou 10 plântulas, as quais foram colocadas em 30 mL de água ultrapura a temperatura ambiente. Após três horas foi realizada a primeira medição (EC1), em seguida as mesmas amostras foram submetidas às mesmas condições de autoclavagem durante 20 min e a segunda medição (EC2) foi realizada em temperatura ambiente. A extrusão de eletrólitos (CE) foi expressa de acordo com a fórmula $EC = (EC1/EC2) \times 100$ (LUTTS et al., 1996).

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade de variâncias (Breusch-Pagan), utilizando-se o pacote lmtest. Posteriormente, os resultados foram submetidos a análise de variância usando o teste F, e quando houve efeito significativo para as variáveis quantitativas foi ajustado modelo de regressão quadrática.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção de Grãos, Teor e Qualidade do Óleo de Três Genótipos de Girassol Sob Diferentes Doses de Boro

6.1.1 Análise de Boro, produtividade de grãos e teor de óleo

Na primeira coleta, fase R5, o Helio251 absorveu mais B nos ambientes com menor disponibilidade do nutriente (0 e 2,5 kg.ha⁻¹) quando comparado aos demais (Tabela 2). Esta maior remobilização do nutriente pode estar correlacionada à maior exigência do genótipo pelo elemento B. O fato da presença do B em tratamentos onde não foi realizada aplicação de tal micronutriente pode ser justificada pela presença em pequena quantidade deste no solo. Assim, nestas condições, ocorre a atuação dos transportadores de alta afinidade regulados em resposta à disponibilidade de B no ambiente (MIWA; FUJIWARA, 2010). No tratamento de alta dose (8 kg.ha⁻¹), a quantidade do B nos capítulos foi equivalente para todos os genótipos na primeira coleta (Tabela 2).

Na segunda coleta, durante a maturação, houve aumento no teor de B, em relação a primeira coleta, nos capítulos e grãos de todos os genótipos (Tabela 2), ou seja, o nutriente foi remobilizado devido à sua participação na formação do botão floral e desenvolvimento do tubo polínico (JAIN et al., 2015). É conhecido que o movimento do B pelos vasos do xilema ocorre para os locais de maiores perdas de água. Entretanto, há muitas dúvidas sobre a redistribuição do B, que ocorre pelo floema. As espécies vegetais diferem intensamente quanto à mobilidade de B, podendo classificá-las em espécies em que a redistribuição do micronutriente é restrita e espécies em que o B é altamente móvel (BROWN; SHELP, 1997).

No final do ciclo, a aplicação de 5 kg ha⁻¹ de B resultou em maiores teores de B nos tecidos do genótipo BRS324 (Figura 12A), contudo, isso não resultou em maior produtividade de grãos (Figura 12B). Já para o Helio251, o tratamento com alta dose resultou em maior teor do micronutriente no capítulo + grão (Figura 12A) e, conseqüentemente, maior produtividade de grãos (Figura 12B).

Tabela 2 Teor de B nos capítulos na 1ª coleta (fase R5) e nos capítulos e grãos na 2ª coleta (final do ciclo) dos genótipos de girassol BRS323, BRS324 e Helio251, cultivados sob diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹), na fazenda experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (MS).

Teor de B (mg.kg ⁻¹)						
Dose (kg.ha ⁻¹)	Capítulo 1º coleta (R5)			Capítulo 2º coleta (R9)		
	BRS323	BRS324	Helio251	BRS323	BRS324	Helio251
0	13,28 B	14,48 B	19,52 A	38,10 B	17,34 C	47,95 A
2,5	14,25 B	13,51 B	17,70 A	37,57 A	38,18 A	42,64 A
5	16,57 A	13,12 B	17,46 A	52,93 A	22,20 B	52,50 A
8	14,31 A	14,87 A	15,67 A	23,55 B	37,06 A	22,83 B

Dose	Grão			Capítulo + Grão (2º coleta)		
	BRS323	BRS324	Helio251	BRS323	BRS324	Helio251
0	32,49 A	22,12 B	21,61 B	70,59 A	39,46 B	69,56 A
2,5	25,29 A	21,16 B	20,45 B	62,86 A	59,34 A	63,09 A
5	21,67 B	24,31 A	16,50 C	74,60 A	46,50 B	69,00 A
8	24,85 A	19,08 B	26,67 A	48,39 B	56,14 A	49,5 AB

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O genótipo BRS323 remobilizou mais B para o grão em condições de baixa disponibilidade do elemento (Figura 12A), e por isso foi considerado mais eficiente do que os demais. Este fato pode ter contribuído para a manutenção da alta produtividade deste genótipo na ausência de adubação com B (Figura 12B). Neste caso, a absorção do B provavelmente está ocorrendo por canais de membrana não-seletivos ou por transportadores de alta afinidade, ambos ativados sob condições de baixa disponibilidade de B (PRINCI et al., 2016).

Já o genótipo Helio251 foi o mais sensível às variações na disponibilidade de B, pois sua produtividade foi maior nas maiores doses de B (5 e 8 kg.ha⁻¹) quando comparado as demais doses (Figura 12B). Khan et al. (2015) também encontraram efeito benéfico sobre a produção de grãos em híbridos de girassol (Patron 551 e S-278) quando B foi aplicado.

O genótipo BRS324, apesar de não ter sua produtividade de grãos aumentada com as doses de B, teve maior teor de óleo no tratamento de maior dose de B (8 kg.ha⁻¹) e resultados semelhantes entre baixa dose e alta dose, mostrando adaptação em ambas condições de cultivo (Figura 12D). Tahir et al. (2014) observaram maior teor de óleo de

girassol, híbrido Hysun-33, quando aplicado 8 kg.ha⁻¹ de B durante a fase de iniciação do botão floral. Nesse trabalho, os tratamentos não afetaram a produção de óleo no genótipo BRS323, por outro lado, o genótipo Helio251 teve alta produção com a dose de 5 kg, seguido de decréscimo na dose de 8 kg (Figura 12D). A comparação entre genótipos mostra que Helio251 teve maior produção de óleo com a dose de 5 kg.ha⁻¹ de B, e BRS324 teve maior produção nas doses de 2,5 e 8 kg.ha⁻¹.

A aplicação de B resultou no aumento do número de grãos produzidos pelo genótipo Helio251 (Figura 12C), demonstrando ser mais sensível à ausência do micronutriente. Conforme demonstrado por Pattanayak et al. (2017), o B está relacionado à formação do tubo polínico durante o período de floração. De maneira semelhante, neste trabalho, o aumento no número de grãos no genótipo Helio251 pode estar relacionado a maior fecundação, durante a floração, proporcionada pela adubação borácica. Mekki (2015) também observou aumento no número de grãos produzidos em girassol sob adubação borácica.

A correlação entre quantidade de grãos produzidos e os teores de óleo se mostrou negativa para o genótipo BRS323 (Figura 13A). Foi observado efeito de diluição, pois, à medida que mais grãos foram produzidos, foi também observado diminuição no teor de óleo nos grãos. Por outro lado, para o genótipo Helio251 essa correlação foi positiva (Figura 13B), pois o aumento do teor de óleo nos grãos acompanhou o aumento no número de grãos. Alves et al. (2017) encontraram correlação positiva entre produção de grãos e produção de óleo em diferentes genótipos de girassol.

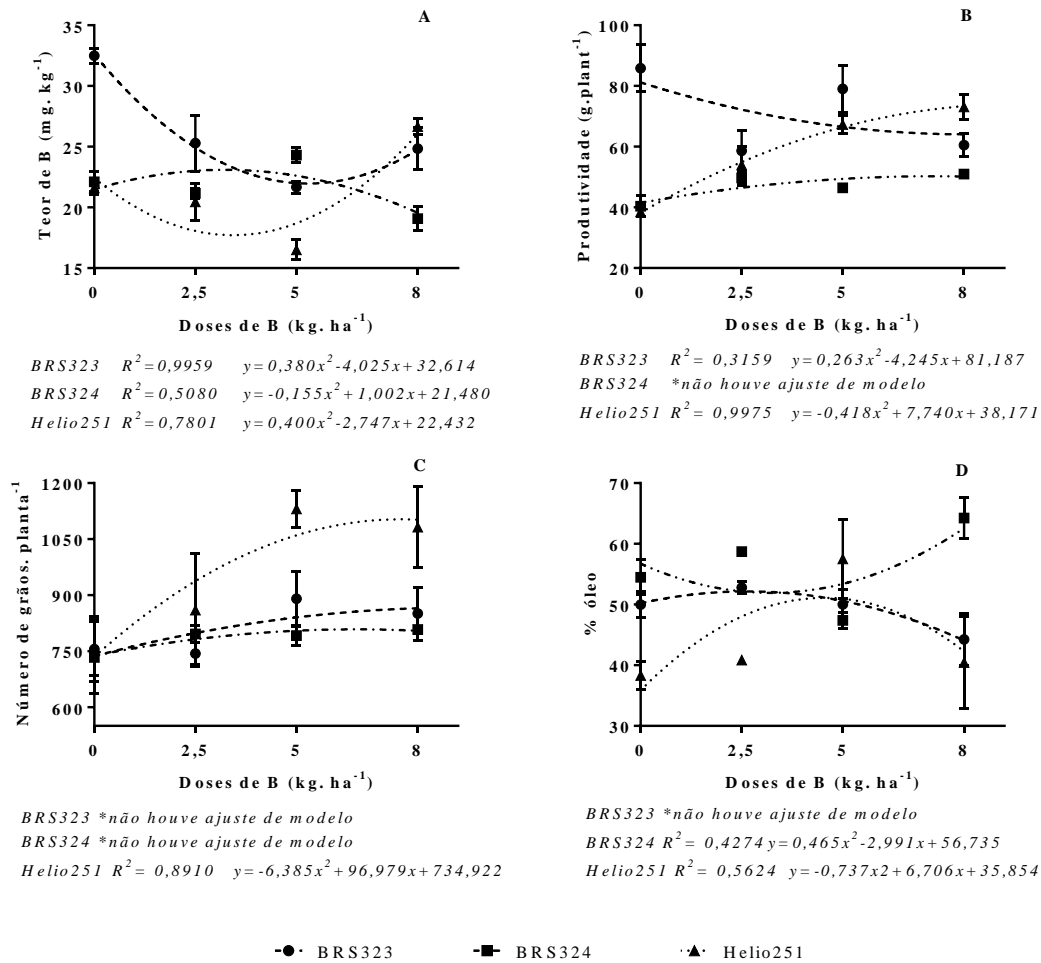


Figura 12 Curvas de regressão do comportamento dos genótipos de girassol Helio251, BRS323 e BRS324 em função das doses de B aplicada no campo (0; 2,5; 5; e 8 kg.ha⁻¹). A - Teores de B nos capítulos + grãos (mg.kg⁻¹). B- Produtividade de grãos (g.planta⁻¹). C- Número de grãos produzidos por planta. D- Teor de óleo (%).

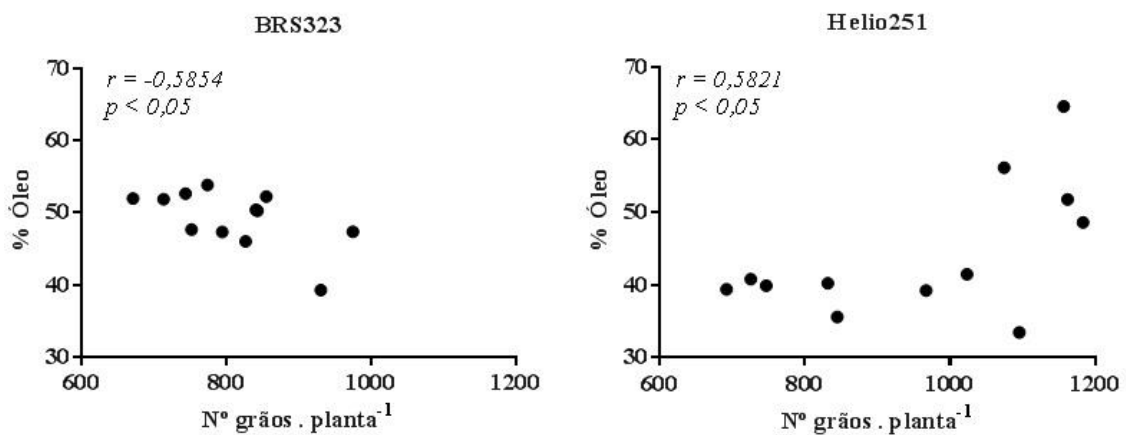


Figura 13 Correlação entre os teores de óleo (%) e o número de grãos produzidos dos genótipos de girassol BRS323 e Helio251.

6.1.2 Teor de proteína bruta nos grãos

Com relação aos teores de proteína bruta nos grãos, esses não foram alterados pela adubação borácica, entretanto, foi observada diferença genotípica para tal parâmetro. O genótipo BRS323 se destacou com os maiores teores de proteína (Tabela 3). Tais resultados estão em oposição aos encontrados por Mehmood et al. (2018), que observaram maior teor de proteína em híbridos de girassol (Hysun-33 and DK-4040) quando aplicado o B e menor teor no controle. Essas diferenças entre os resultados reforçam a existência das particularidades genotípicas.

Tabela 3 Percentual de proteína bruta nos grãos de diferentes genótipos de girassol (BRS323, BRS324, Helio251) submetidos a adubação diferenciada de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹).

Dose (kg.ha ⁻¹)	% proteína bruta		
	BRS323	BRS324	Helio251
0	21,5	19,2	20,2
2,5	19,8	15,0	16,6
5	23,3	16,9	17,0
8	20,8	17,2	18,6
Médias	21,4 A	17,1 B	18,1 B

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

6.1.3 Qualidade do óleo

Embora tenha sido identificado por CG-EM um total de 11 ésteres metílicos de ácidos graxos nas amostras de óleo para todos os tratamentos e genótipos estudados (Tabela 4), para fins de discussão serão levados em conta apenas os quatro ácidos graxos majoritários presentes nos óleos: ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (Figura 14).

Os dados de ácidos oleico e linoleico, presentes na Tabela 5, não apresentam a influência das doses de B na produção de ácidos graxos, e como observado, não houve diferença, demonstrada pelas comparações no interior da tabela (sem letras), havendo significância apenas nas médias dos cultivares, evidenciando uma influência genotípica ao invés de resposta à fertilização borácica. Dentre os três, o genótipo Helio251 produziu mais ácido linoleico e menos ácido oleico, enquanto o genótipo o BRS323, produziu mais oleico e menos linoleico que os demais (Tabela 5). Ácidos monoinsaturados, como o

oleico, tem sido alvo de interesse para a indústria de alimentos, pois sofrem menos alterações oxidativas que ácidos poli-insaturados como linoleico (MEKKI et al., 2015).

Tabela 4 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos genótipos de girassol Helio251, BRS323 e BRS324, cultivados na Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados-MS.

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Área (%)		
		Helio251	BRS323	BRS324
Palmítico	19,77	8,49	7,92	8,59
Linoleico	24,86	45,20	38,98	40,72
Oleico	25,07	34,07	43,25	39,78
Linolênico	25,16	1,51	1,36	1,53
Esteárico	25,76	6,67	6,51	6,17
Aracdônico	30,10	0,22	0,18	0,17
eicosapentaenoico	30,21	0,25	0,22	0,19
Eicosanóico	30,64	0,35	0,26	0,32
Eneicosanóico	31,39	0,65	0,65	0,55
Beénico	36,66	1,88	1,85	1,67
Lignocérico	41,57	0,77	0,71	0,67

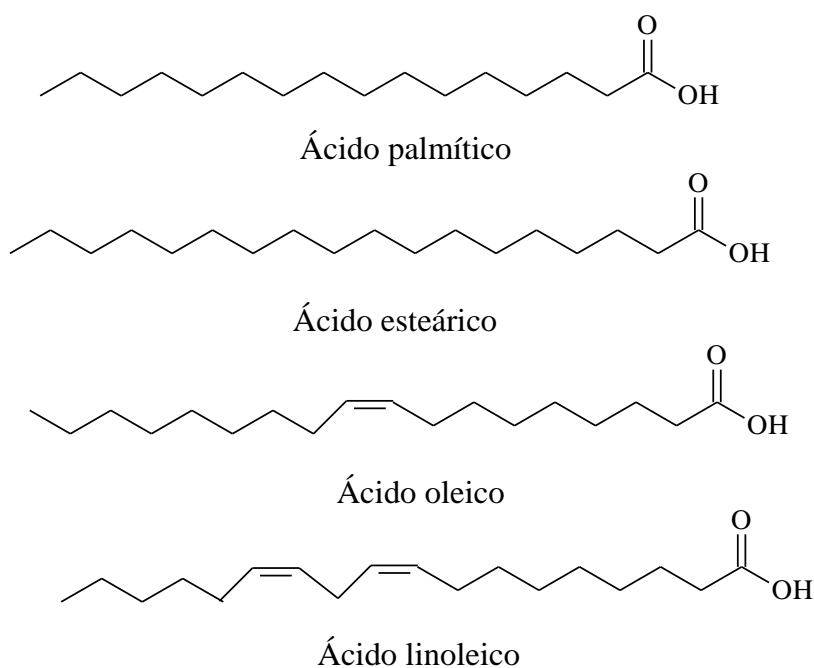


Figura 14 Estruturas dos quatro principais ácidos graxos encontrados no óleo de girassol.

Tabela 5 Teores (%) de ácido linoleico e oleico presentes no óleo dos genótipos de girassol BRS 323, BRS 324, Helio251 cultivados com diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹), aplicadas no plantio.

Dose (kg.ha ⁻¹)	Ácido Linoleico (C18:2)			Ácido Oleico (C18:1)		
	BRS323	BRS324	Helio251	BRS323	BRS324	Helio251
0	39,48	40,34	44,17	42,53	41,54	34,8
2,5	40,19	40,40	46,15	42,33	39,27	32,82
5	38,24	40,79	46,56	42,34	39,13	33,00
8	37,95	41,34	43,93	44,65	39,17	35,64
Médias	38,97 C	40,72 B	45,20 A	42,96 A	39,78 B	34,07 C

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O genótipo BRS324 apresentou valores médios de ambos os ácidos (linoleico e oleico). Diferenças no perfil de ácidos graxos entre genótipos estudado foram observadas (Figura 15). Entretanto, os perfis dos ácidos graxos dos óleos dos genótipos, Helio251(Figura 16), BRS323 (Figura 17) e BRS324 (Figura 18), não sofreram alteração com a aplicação dos tratamentos, ou seja, através dos cromatogramas foi possível observar que o elemento B não interferiu no perfil dos ácidos graxos. Dhillon et al. (2017), não encontraram influência da adubação borácica foliar sobre o perfil de ácidos graxos em girassol. Já Mekki (2015), detectou que o elemento B influenciou no perfil dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico, em duas cultivares de girassol (Sakha-53 e Giza-102) submetidas a adubação foliar com o nutriente. Tais trabalhos corroboram com os resultados obtidos neste estudo, reforçando a ideia de que a resposta dos genótipos de girassol ao B pode ser diferente quanto ao perfil dos ácidos graxos encontrados, sendo essa uma característica governada predominantemente pelas características genotípicas da cultura.

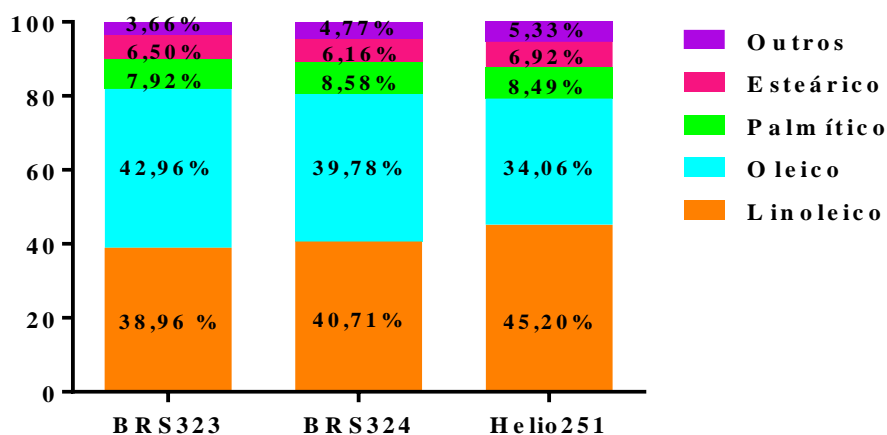


Figura 15 Efeito da característica genotípica no perfil dos ácidos graxos presente no óleo de diferentes genótipos de girassol (BRS323, BRS324 e Helio251).

Quando analisados os ácidos graxos saturados, foi constatada oscilação nas concentrações dos ácidos palmítico e esteárico entre doses e genótipos (Tabela 6). Apesar do ácido palmítico e do esteárico serem precursores para a síntese de ácidos graxos insaturados, os ácidos oleico e linoleico não apresentaram oscilações no seu perfil, o que demonstra que estes ácidos não foram influenciados pelas doses de B aplicadas.

Apesar do genótipo BRS324 ter apresentado maior teor de ácido palmítico quando a dose de 5 kg foi aplicada (Tabela 6), esta dose não deveria ser considerada a indicada para a produção de óleo para o consumo humano, que deve dar preferência aos óleos com maiores teores de ácidos graxos insaturados. O mesmo acontece com o Helio251 em relação ao teor de ácido esteárico, que foi maior na ausência de B, seguido de uma queda no tratamento de melhor produção de óleo (5 kg.ha⁻¹; Tabela 4).

Tabela 6 Teores (%) de ácido palmítico e esteárico presentes no óleo dos genótipos de girassol BRS 323, BRS 324, Helio251 cultivados com diferentes doses de B (0; 2,5; 5 e 8 kg ha⁻¹), aplicadas no plantio.

Dose (kg.ha ⁻¹)	Ácido Palmítico (C16:0)			Ácido Esteárico (C18:0)		
	BRS323	BRS324	Helio251	BRS323	BRS324	Helio251
0	7,69 B	8,29 A	8,49 A	6,23 B	6,35 B	7,33 A
2,5	8,05 B	8,31 AB	8,75 A	6,84 A	5,92 C	6,39 B
5	7,67 C	9,14 A	8,38 B	6,31 AB	6,14 B	6,64 A
8	8,26 A	8,60 A	8,34 A	6,65 A	6,25 AB	6,32 B

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

HELIO 251

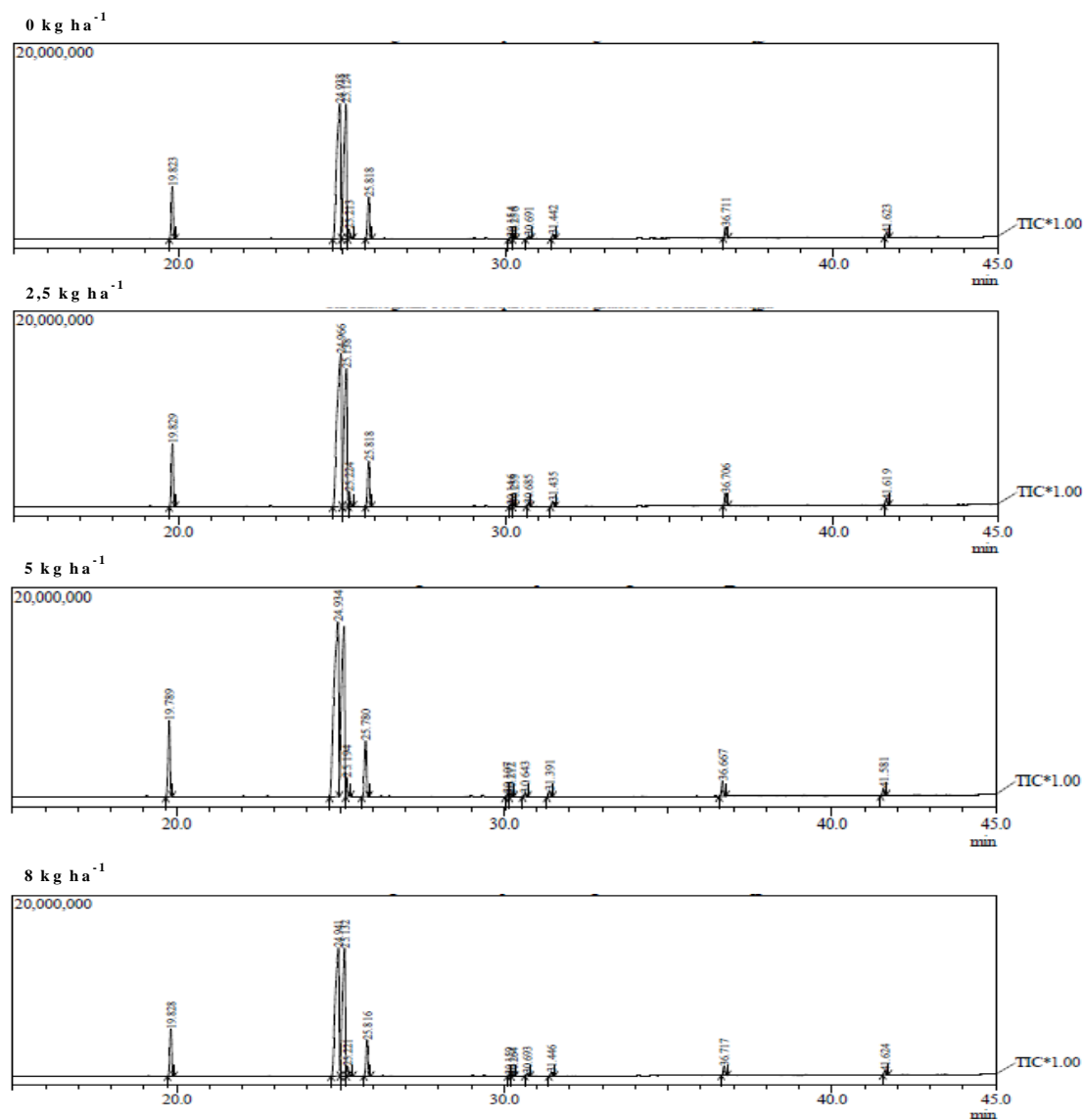


Figura 16 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo Helio251 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹ de B.

BRS323

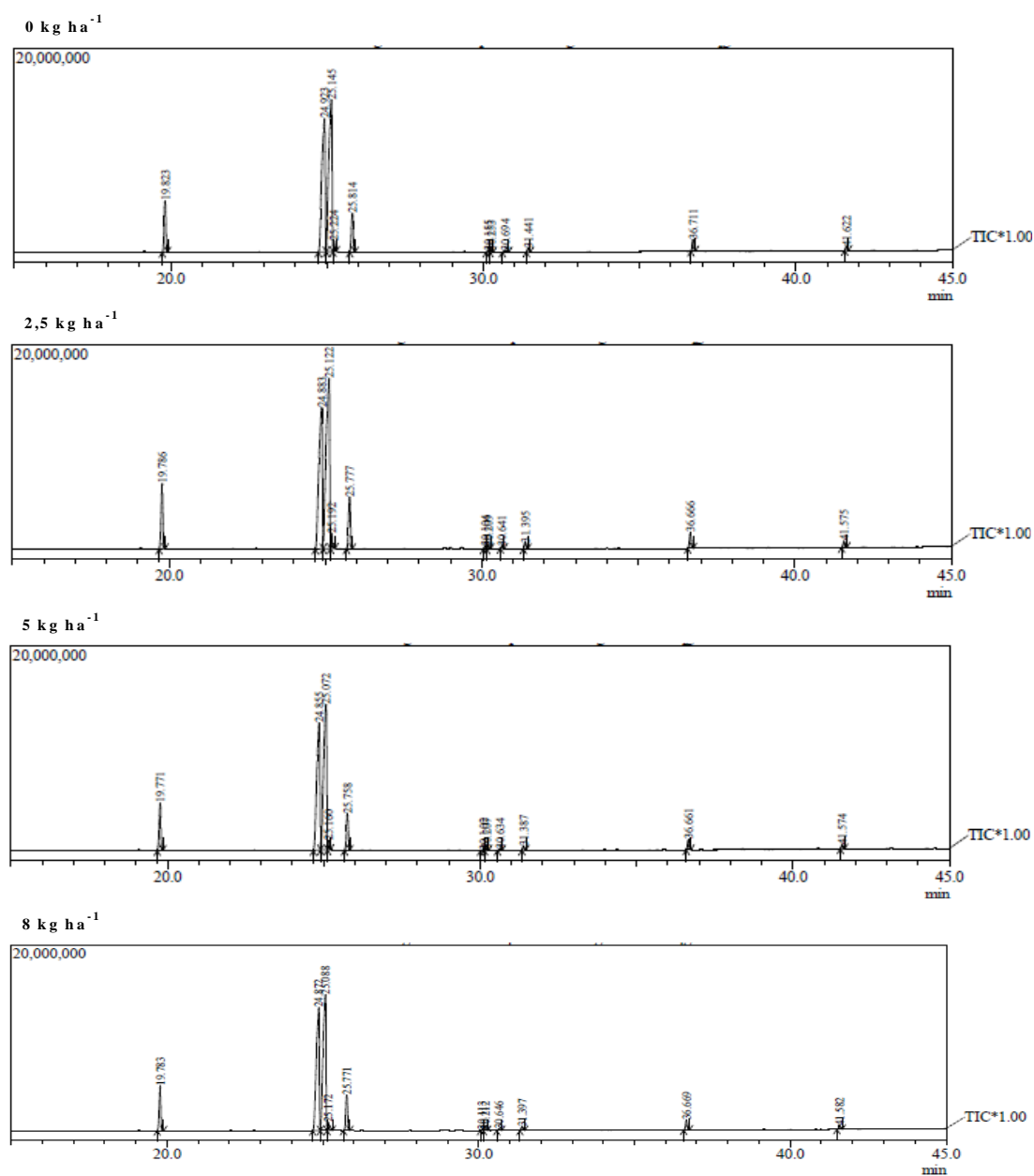


Figura 17 Perfis dos ésteres metálicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo BRS323 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹ de B.

BRS324

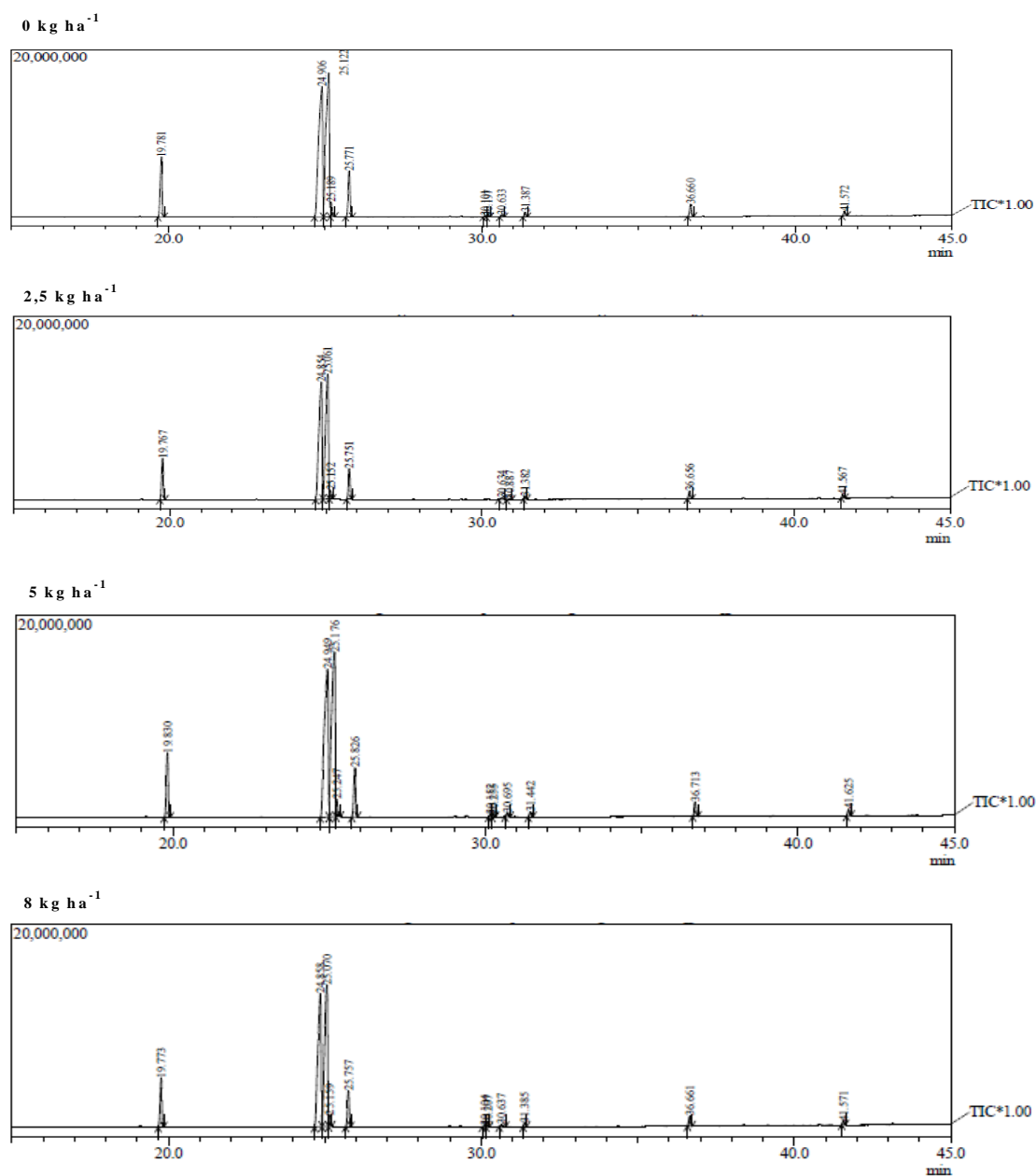


Figura 18 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM no óleo do genótipo BRS324 de girassol, com dose de 0; 2,5; 5 e 8 kg.ha⁻¹ de B.

Analisados em conjunto, os dados apontam o genótipo BRS323 como sendo mais eficiente na absorção de B e produtividade de grãos em ambientes com baixa disponibilidade desse nutriente (dose 0 kg.ha⁻¹ de B). Quando comparado com os demais genótipos, o BRS323 apresentou os maiores teores de proteína bruta e ácido oleico. Por outro lado, o genótipo Helio251 apresentou os maiores teores de ácido linoleico, com melhor produtividade e teor de óleo no tratamento de 5 kg.ha⁻¹. Já o BRS324, apesar de

não ter sua produtividade influenciada pelo B, exibiu maior teor de óleo nos grãos quando aplicado o micronutriente.

6.1.4 Conclusão parcial

É evidente a importância do B para a produtividade de grãos e teor de óleo em girassol. Contudo, os genótipos se comportam de maneira diferente à aplicação do micronutriente, sendo necessário verificar a dose adequada para cada um dos genótipos. Em relação ao perfil dos ácidos graxos e teor de proteína bruta nos grãos, não foi observada interferência da adubação borácica na qualidade do óleo, reforçando a tese de que as características genotípicas são determinantes, reforçando a necessidade da realização de novos estudos visando elucidar o potencial agrônomo de cada genótipo avaliado.

6.2 Capacidade Antioxidante de Extratos de Girassol

2.2.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Em relação aos teores de substâncias fenólicas totais encontradas nas folhas, o extrato aquoso demonstrou alto teor de fenólicos na ausência do elemento B, quando comparado aos tratamentos com 2,5 e 8,0 kg.ha⁻¹ de B (Figura 19A). Os dados aqui obtidos corroboram relatos da literatura os quais indicam que a deficiência prolongada de boro nas plantas resulta no acúmulo de fenóis (GUPTA, 2007).

O tipo de solvente utilizado no processo extrativo influencia no teor de metabólitos extraídos. Como exemplo, temos a comparação entre o extrato aquoso e o extrato etanólico quanto ao teor de fenólicos totais (Figura 19A). Nesta análise, foi observado maior poder de extração de fenólicos no solvente hidroalcoólico entre 2,5 e 8 kg. ha⁻¹ de B, seguido de uma queda brusca com o aumento da adubação com B no campo. Liu et al. (2015), trabalhando com folhas de laranjeira sob deficiência de B, observaram aumento nos níveis de fenóis nas folhas superiores, a partir de extratos metanol/clorofórmio. Segundo esses autores, o aumento dos fenóis indica que o efeito do B sobre o metabolismo do fenol nas plantas cítricas pode ser consequência de rupturas na estrutura foliar.

Foi determinado um menor teor de fenólicos nos extratos aquosos de plantas que receberam adubação borácica na dose de 2,5 kg.ha⁻¹ de B, quando comparados aos

hidroalcoólicos (Figura 19A). Essa observação pode ser corroborada com a análise por CLAE-DAD, que mostrou que o perfil químico para o extrato hidroalcoólico apresentou um número maior de ácidos fenólicos (derivados de cinâmico e de benzoico) do que o extrato aquoso com a mesma dosagem de boro.

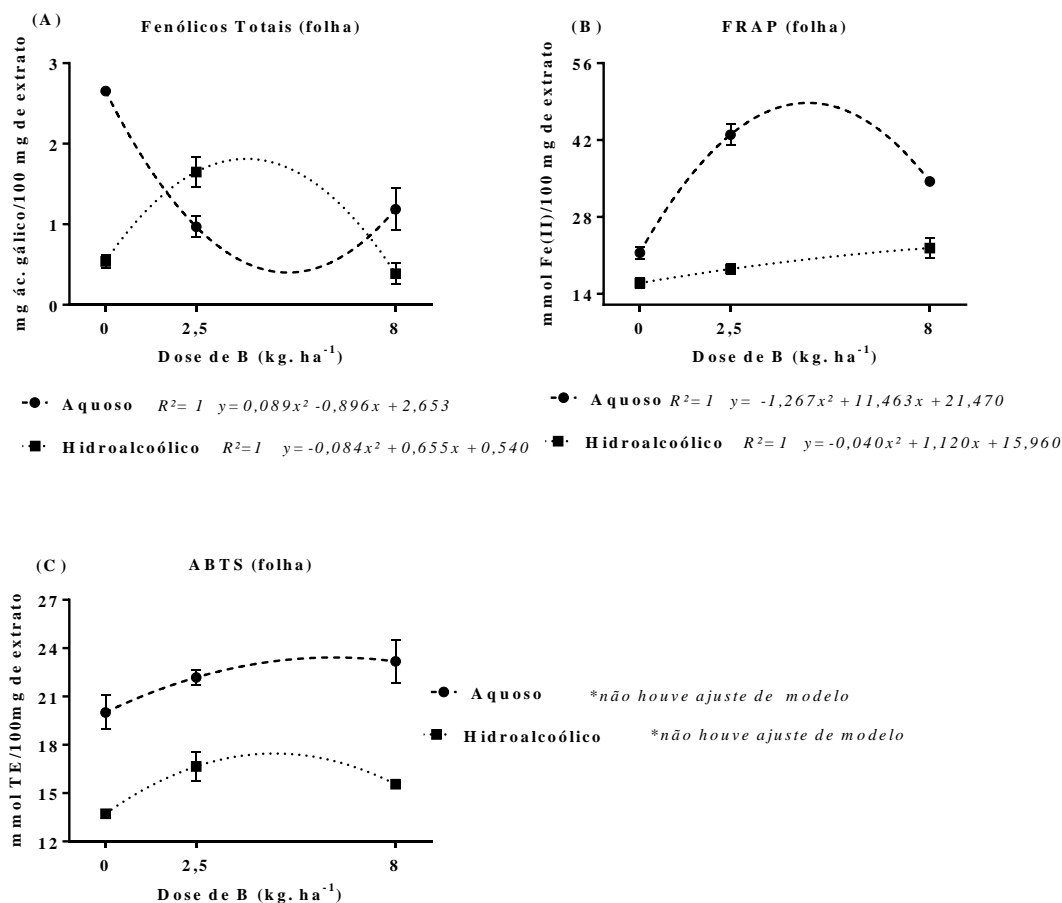


Figura 19. Curvas de regressão dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de folhas de plantas de girassol (Helio251) submetidas a diferentes doses de B no campo (0; 2,5 e 5 kg.ha⁻¹). A - Curvas de regressão dos teores de fenólicos totais dos extratos aquoso e hidroalcoólico. B - Curvas de regressão da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) dos extratos hidroalcoólicos e aquosos. C - Curvas de regressão da capacidade antioxidante pelo método ABTS dos extratos hidroalcoólicos e aquosos.

No extrato hidroalcoólico foram identificados por CLAE-DAD os seguintes derivados de ácidos cinâmicos: ácido clorogênico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, além de dois outros derivados de ácido cafeoilquínico que não foram identificados por falta de padrão; além de dois derivados de ácido benzoico: ácido

vanílico, ácido siríngico (Figura 20). Já no extrato aquoso só foi possível identificar três derivados de ácidos cafeoilquínicos: ácido clorogênico, ácido-4-clorocafeoilquínico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (Figura 21). Essas substâncias são muito mais solúveis em água do que os derivados de ácidos benzoicos identificados no extrato hidroalcoólico.

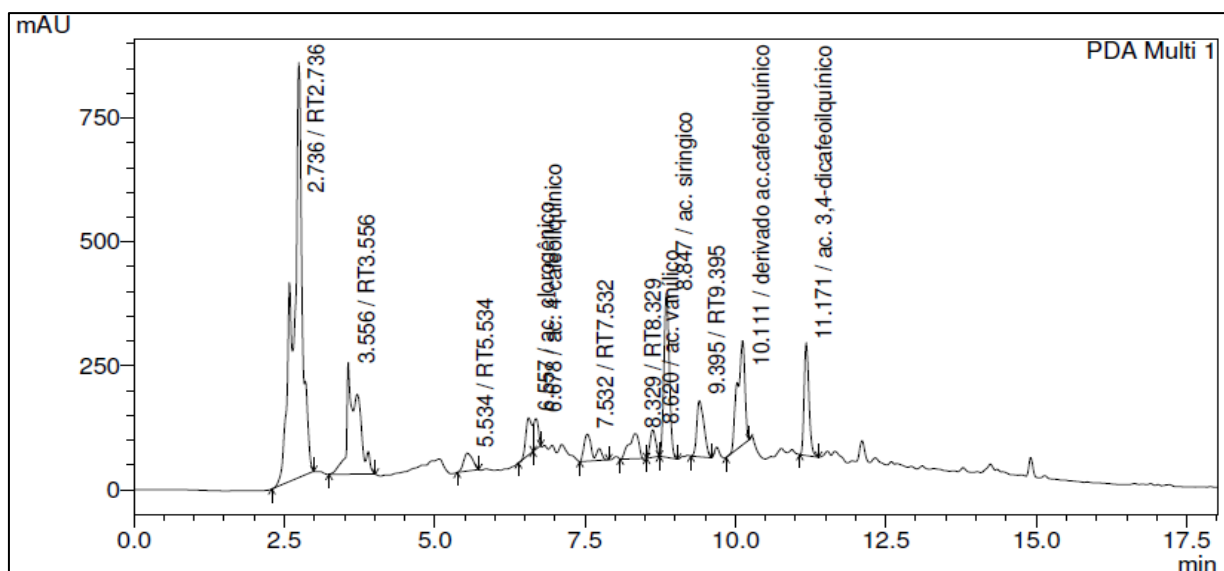


Figura 20 Perfil químico do extrato hidroalcoólico de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B por CLAE-DAD em fase reversa.

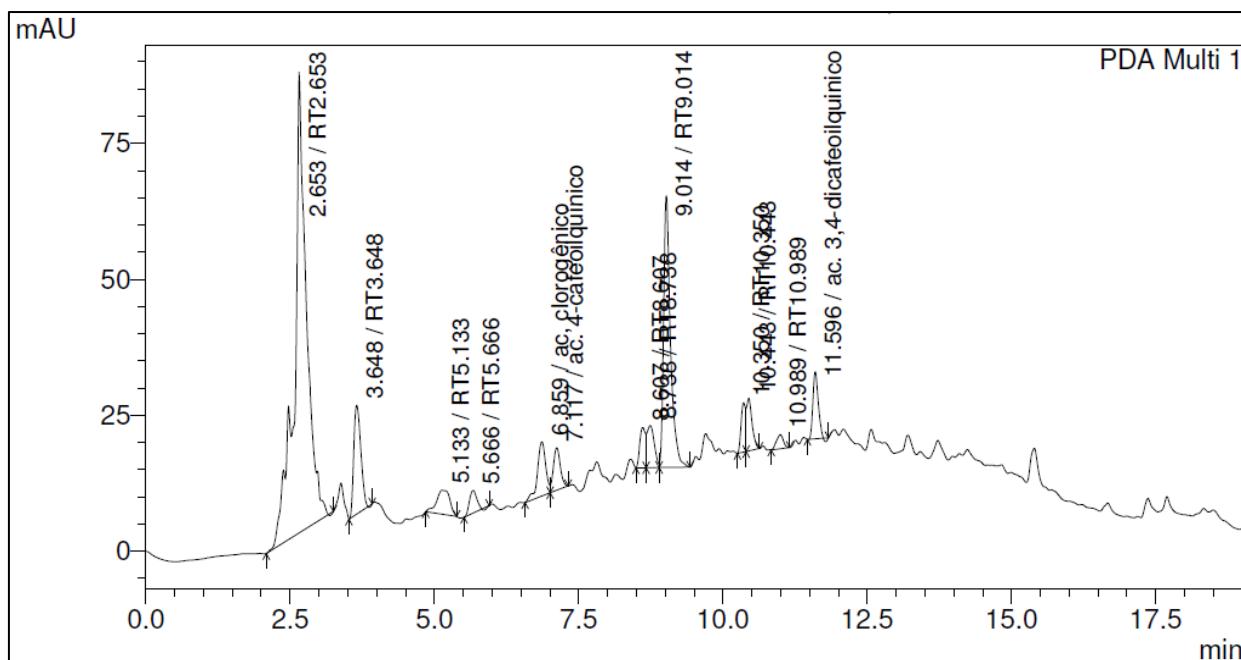


Figura 21 Perfil químico do extrato aquoso de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B por CLAE-DAD em fase reversa.

As estruturas das substâncias identificadas nos dois extratos estão na Figura 22.

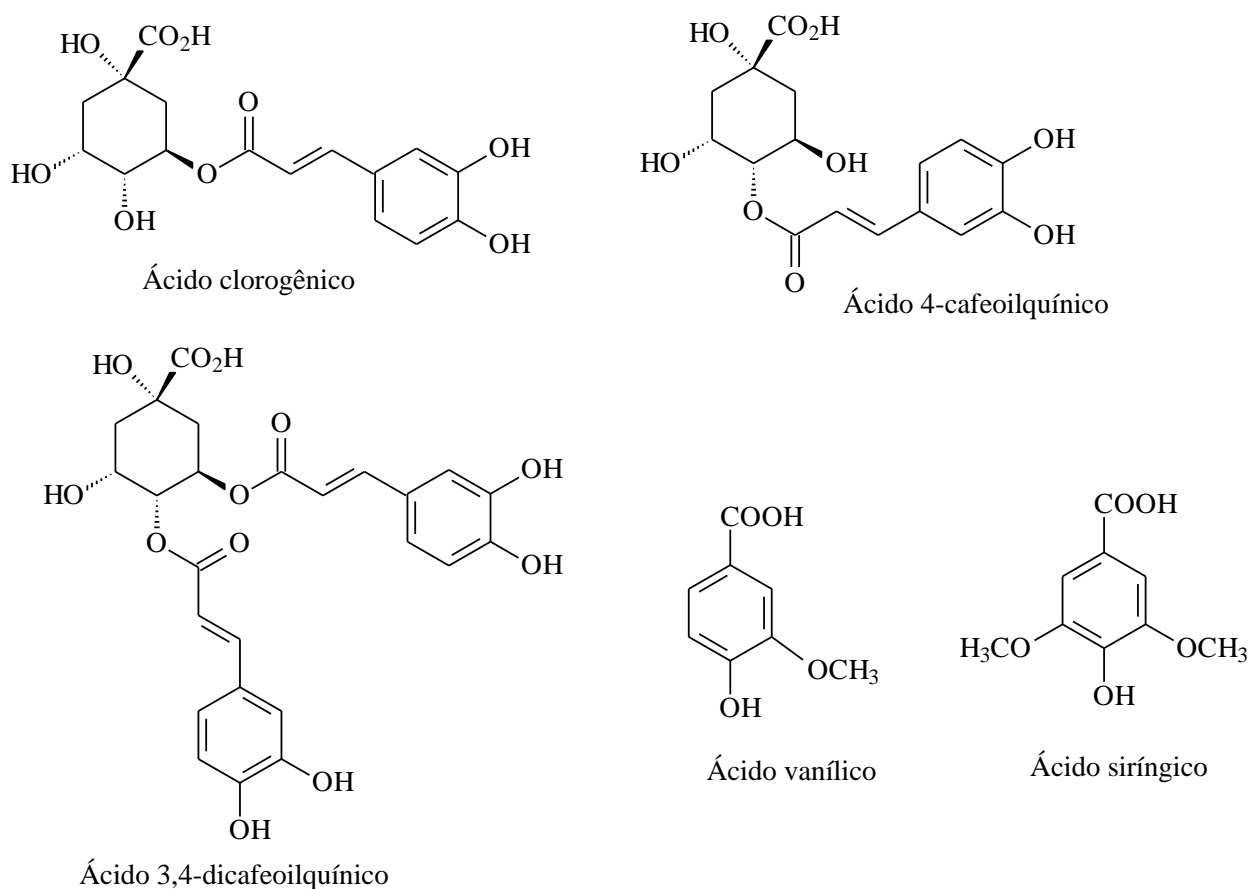


Figura 22 Substâncias identificadas por CLAE-DAD no extrato aquoso e hidroalcoólico de folha de plantas de girassol cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B.

Entretanto ao avaliar a capacidade antioxidante pelo método de oxi-redução FRAP, o extrato aquoso apresentou maior capacidade antioxidante, quando comparado ao extrato hidroalcoólico, para os tratamentos com doses mais elevadas de boro, de 2,5 e 8 kg.ha⁻¹ (Figura 19B). Com isso, foi verificado que o solvente hidroalcoólico extraiu mais substâncias fenólicas, mas as substâncias extraídas não necessariamente possuem estrutura com capacidade antioxidante de redução do íon ferro. Estes íons são bastante ativos em reações de óxido-redução, tornando-os potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). Giada; Mancini-Filho (2009), ao avaliarem a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos aquosos e etanólicos de cotilédones de girassol pelos métodos FRAP, DPPH e ORAC, concluíram também que o extrato aquoso apresentou maior capacidade antioxidante.

A análise pelo método ABTS demonstrou que não há diferenças na capacidade antioxidante, quando comparadas as doses de extrato aquoso (Figura 19C). Ou seja, esta

característica aparentemente independe da dose de B aplicada no campo. Não obstante, este tipo de extrato demonstrou maior potencial antioxidante quando comparado ao extrato hidroalcoólico (Tabela 7). Este método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (SUCUPIRA et al., 2012). O extrato hidroalcoólico apresentou menor capacidade antioxidante na ausência do elemento B (Figura 19C), corroborando os valores de fenólicos na mesma dose (Figura 19A).

Tabela 7 Fenólicos totais e FRAP dos extratos foliares dos tipos aquosos e hidroalcoólicos de plantas de girassol (Helio251), cultivadas com diferentes doses de B no campo.

Dose (kg.ha ⁻¹)	Fenólicos totais ^a		FRAP ^b	
	aquoso	hidroalcoólico	aquoso	hidroalcoólico
0	2,64 A	0,58 B	21,47 A	15,96 B
2,5	1,04 B	1,56 A	42,96 A	18,51 B
8	1,18 A	0,44 B	34,47 A	22,33 B

Dose (kg.ha ⁻¹)	ABTS ^c	
	aquoso	hidroalcoólico
0	20,01	13,72
2,5	22,18	16,65
8	23,18	15,55
médias	21,79 A	15,31 B

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. a. mg de gálico/100 mg de extrato. b. mmol Fe(II)/100 mg de extrato. c. mmol TE/100mg de extrato

Em relação aos extratos de capítulos, preparados apenas com plantas cultivadas com a dose de 2,5 kg.ha⁻¹ de B, foram observados também maiores teores de fenólicos para o solvente hidroalcoólico (Figura 23A, Tabela 8). Entretanto, assim como nos extratos de folhas na dose de 2,5 kg.ha⁻¹ de B, o extrato aquoso demonstrou ter capacidade antioxidante superior pelo teste de FRAP (Figura 23B). O extrato aquoso pode ter extraído substâncias com maior capacidade antioxidante, os quais merecem estudos posteriores visando sua identificação, uma vez que não houve influência da quantidade de B aplicada durante o cultivo. Considerando a capacidade antioxidante pela captura do radical livre ABTS⁺, não houve diferenças entre tipos de extratos, aquoso ou hidroalcoólico, produzidos à partir dos capítulos (Tabela 8).

Segundo Seth; Aery (2017), compostos fenólicos são indicadores de estresse em plantas. No referido trabalho, os autores analisaram variedades de trigo submetidas a diferentes doses de B, e correlacionaram mudanças ocorridas nos constituintes bioquímicos com os tratamentos de B aplicados. Dentre as mudanças observadas, eles verificaram os níveis de fenólicos totais, conteúdo de prolina e atividade da peroxidase.

Durante o desenvolvimento dos nossos estudos, não foi possível a realização de análises com os outros tratamentos nos extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulo. Ainda assim, a realização deste tipo de análise é considerada importante para averiguar uma possível variação em relação ao processo extrativo, como ocorreu no extrato hidroalcoólico e aquosos nas folhas.

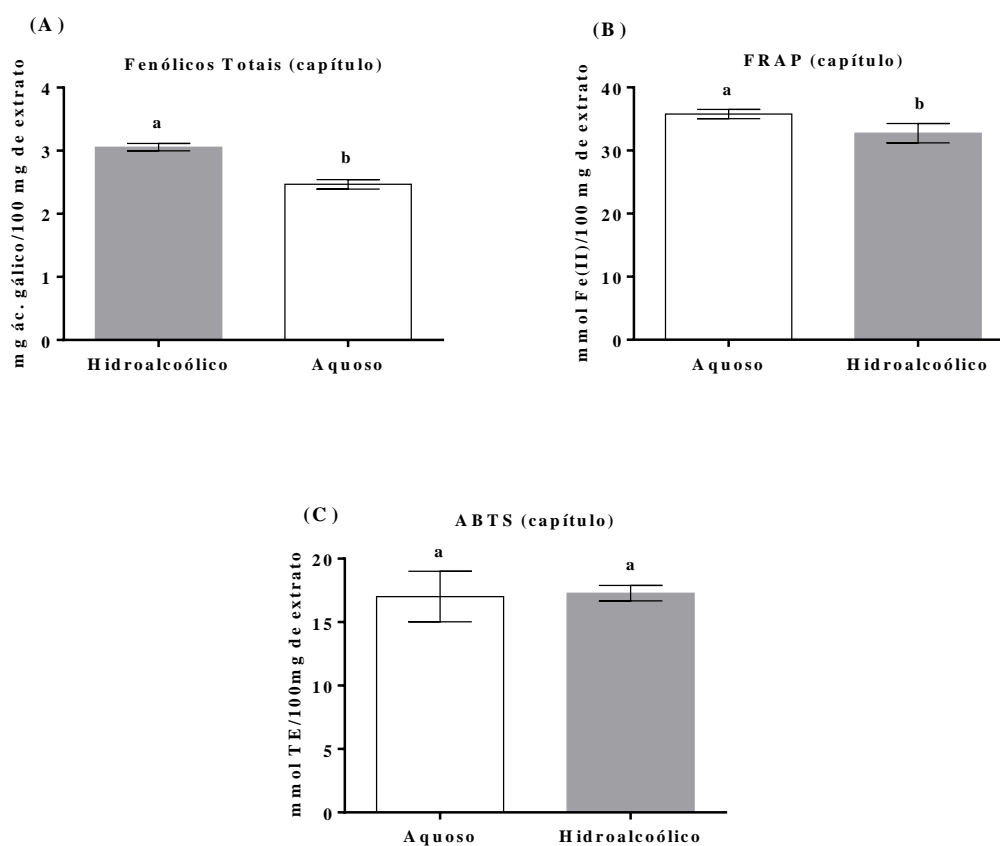


Figura 23 (A) Teores de fenólicos totais encontrados nos extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. (B) Capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) de extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. (C) Capacidade antioxidante pelo método ABTS de extratos aquosos e hidroalcoólicos de capítulos de girassol. As barras representam o erro padrão médio das repetições, e seguidas das mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 8 Fenólicos totais, FRAP e ABTS dos extratos de capítulo dos tipos aquoso e hidroalcoólico de plantas de girassol (*Helio251*) cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B no campo.

Dose (kg.ha ⁻¹)	Fenólicos totais ^a		FRAP ^b		ABTS ^c	
	Aq.	H	Aq.	H	Aq.	H
2,5	2,47 B	3,06 A	35,77 A	32,75 B	17,01 A	17,28 A

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. a. mg de gálico/100 mg de extrato. b. mmol Fe(II)/100 mg de extrato). c. mmol TE/100mg de extrato. Aq. aquoso. H. hidroalcoólico.

Não foram encontrados teores de flavonoides totais nos extratos avaliados, dados que corroboram com as análises realizadas por CLAE-DAD, onde não se observou nenhum pico no cromatograma com curvas de absorção no UV para esta classe de substância. Do mesmo modo, Mercali et al (2012) não detectaram flavonoides em extratos etanólicos de broto de girassol. Contudo, dados na literatura acusam a presença de flavonoides em extratos metanólicos de folhas do gênero *Helianthus* (SYTAR et al., 2018)

Em sementes de girassol, os principais compostos detectados por Pedrosa et al. (2000), no núcleo e na casca, foram o ácido clorogênico, o ácido cafeíco e dois derivados cafeoilquínicos.

6.2.2 Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

No ensaio de viabilidade celular, o extrato foliar aquoso de plantas cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B apresentou atividade antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 24A), resultado comprovado nos testes *in vitro* realizados com FRAP (Figura 19B). Por outro lado, com o extrato aquoso produzido a partir de plantas cultivadas sob excesso de B, não houve proteção das leveduras do estresse oxidativo (Figura 24B). Este fato corrobora os dados de FRAP, onde foi notada uma queda na capacidade antioxidante do extrato de reduzir íons ferro à partir de plantas cultivadas sob 2,5 kg.ha⁻¹ de B (Figura 19B).

O extrato etanólico também apresentou atividade antioxidante no tratamento onde as plantas foram adubadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B. Porém, essa atividade demonstrou-se maior em comparação com a realizada no extrato aquoso. Este fato pode estar associado aos maiores níveis de fenólicos totais encontrados neste tratamento, quando comparado

as demais doses e ao extrato aquoso (Figura 19A; Tabela 7). Os extratos foliares etanólico e aquoso de plantas cultivadas sob excesso de B não possuem atividade antioxidante *in vivo*, pois a viabilidade celular foi semelhante ao controle positivo, realizado com peróxido (Figura 24B e D). Na análise de fenólicos, há um decréscimo destes nessas condições no extrato etanólico, e um decréscimo da capacidade antioxidante no teste FRAP no extrato aquoso.

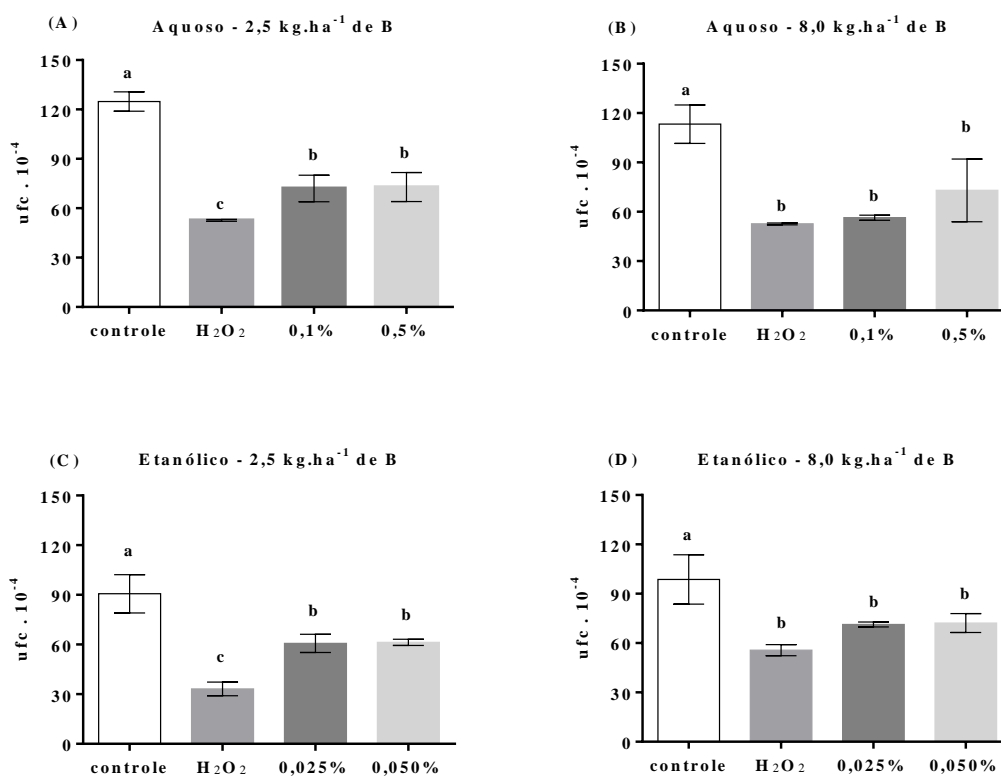


Figura 24 Ensaios de viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* após 1 h de exposição ao agente estressante H₂O₂ (1,0 mM) e com pré-tratamentos com extratos etanólico e aquosos de folhas de girassol (Helio251) por 2 h. **A** - Extrato aquoso de folhas de plantas submetidas a dose de 2,5 kg.h⁻¹ de B no campo. **B** - Extrato aquoso de folhas de plantas submetidas a dose de 8 kg.h⁻¹ de B no campo. **C** - Extrato etanólico de folhas de plantas submetidas a dose de 2,5 kg.h⁻¹ de B no campo. **D** - Extrato etanólico de folhas de plantas submetidas a dose de 8 kg.h⁻¹ de B no campo. As barras de erro representam o erro padrão médio (n=3). Os tratamentos seguidos das mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Foi realizado um teste de viabilidade celular com extrato aquoso de capítulo de plantas cultivadas com 2,5 kg.ha⁻¹ de B no campo. Este extrato demonstrou maior

atividade antioxidante do que os extratos foliares. O tratamento de 0,5% de extrato, apresentou valores estatísticos similares ao controle negativo quando comparado pelo teste de Tukey (Figura 25). De acordo com a análise da capacidade antioxidante dos extratos de redução do íon ferro, o extrato aquoso de capítulo de plantas nessas condições de cultivo possui maior capacidade antioxidante que o extrato hidroalcoólico. WEISZ et al., 2009 identificaram onze compostos por cromatografia líquida de alta eficiência em cascas e amêndoas de girassol, sendo o ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) a substância majoritária. Uma hipótese seria o fato dos grãos serem formados e estarem inseridos no capítulo poderia indicar que neste compartimento haja vestígio das substâncias antioxidantes encontradas nos grãos.

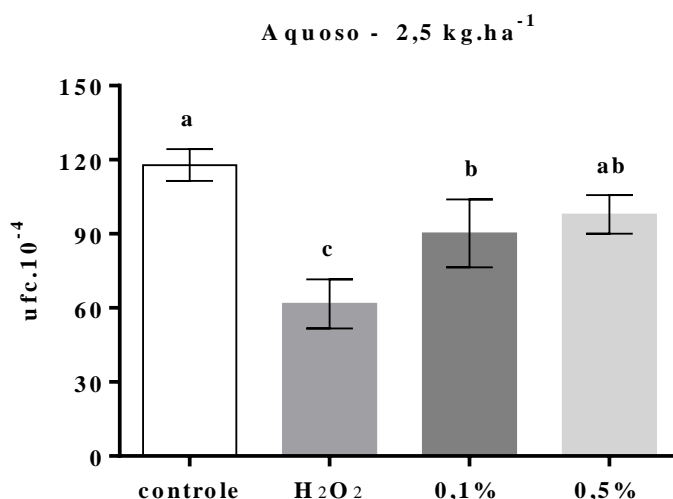


Figura 25 Gráfico de viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* após 1 h de exposição ao agente estressante H₂O₂ (1,0 mM), e com pré-tratamento com extrato aquoso de capítulo de girassol (Helio251) nas concentrações de 0,1 e 0,5%. As barras de erro representam o erro padrão médio (n=3). Os tratamentos seguidos das mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Já se sabe que a farinha de girassol desengordurada, proveniente dos grãos, é uma fonte promissora de substâncias fenólicas que podem ser recuperados e utilizados como antioxidantes naturais (WEISZ et al., 2009). Os ensaios realizados neste trabalho demonstram que os extratos de folha e capítulo também possuem característica antioxidante. Futuramente, poderiam ser realizados testes no intuito de explorar novas possibilidades de aplicação para estes tipos de extratos. Destacando aqui que o extrato aquoso demonstrou ser mais ativo para a capacidade antioxidante. O uso da água no lugar

do etanol, um solvente mais tóxico e caro, permitiria também ilustrar o princípio da química segura, o uso de recursos renováveis e a diminuição na geração de efluentes tóxicos. Adicionalmente, o extrato aquoso de capítulo destacou-se com alta atividade antioxidante *in vivo* no tratamento de 0,5%, ainda que este extrato não tenha passado por testes com outros tratamentos de campo com outros materiais vegetais, como foi feito com os extratos de folha. Este tratamento foi semelhante ao de controle apenas com meio de cultura. Não foram encontrados registros de ensaios de viabilidade celular para testar atividade antioxidante de extratos de girassol com a intenção de proteger as leveduras dos danos causados pelo estresse oxidativo. Este fato abre um leque de possibilidades futuras para este estudo.

6.2.3 Conclusão parcial

Os ensaios realizados demonstraram que os extratos oriundos de folhas e capítulos de girassol (Helio251) possuem potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro*.

Nas análises *in vitro*, as concentrações de substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante pelo teste FRAP foram dose-dependentes para os extratos hidroalcoólicos. Essa capacidade antioxidante verificada nos ensaios *in vitro* foi também confirmada pela análise qualitativa de cromatografia líquida. Onde foi verificada a presença de ácidos fenólicos do tipo cinâmico.

Ainda, pode-se concluir que os extratos de plantas, tanto o etanólico quanto o aquoso, não possuem atividade antioxidante *in vivo* quando sob excesso de B. Além disso, os testes mostram que o extrato aquoso de capítulo apresenta maior atividade antioxidante que os extratos foliares.

6.3 Potencial Alelopático de Extratos de Folhas e Capítulos de Girassol Sobre a Germinação de *Digitaria insularis*

6.3.1 % de germinação e IVG

Ao analisarmos os efeitos do extrato aquoso de folha sobre a germinação de capim amargoso é notório seu poder alelopático (Figura 26 e 27). As sementes que receberam os tratamentos não germinaram em nenhuma das condições avaliadas (Figura 28), com índice de velocidade de germinação igual a zero (Figura 29). Todos os órgãos das plantas

podem apresentar potencial alelopático, entretanto folhas e raízes são as principais fontes de aleloquímicos (ALMEIDA et al, 2008). Pannacci et al. (2013), através de ensaios em placas de petri e em vasos, testaram os efeitos fitotóxicos de extratos de folhas e caules de diferentes genótipos de girassóis, ambos os tipos de extratos tiveram potencial alelopático sobre a germinação e crescimento de plantas de *Sinapis alba* e *Lolium multiflorum*, com boa seletividade contra a germinação de sementes de *Triticum aestivum*.

Em nossos estudos, incluímos a análise dos capítulos a fim de verificar se esta parte da planta também possui fonte de aleloquímicos com potencial uso em estratégias de alelopatia. Os resultados obtidos foram animadores, pois as sementes submetidas ao tratamento com extrato de capítulo tiveram uma redução drástica na quantidade de sementes germinadas nas concentrações de 2,5 e 5% e inibição total na concentração de 10%. Nikneshan et al. (2011) observaram esse efeito dose-dependente sobre a germinação de plantas de folhas largas e estreitas, à medida que eles aumentaram as concentrações de extratos foliares de girassol também aumentaram o efeito inibitório sobre os índices de germinação.

Com sete dias sob influência do tratamento com 10% de extrato, tanto de folha quanto o de capítulo, todas as sementes permaneceram sem nenhum indício de emissão de radículas, indicando completa inibição do crescimento da radícula (Figuras 26 e 27). Oliveira et al. (2015) não encontraram efeito inibitório de extrato aquoso da parte aérea de girassol sobre a germinação de alface, planta modelo para testes alelopáticos. No entanto esses autores não concentraram os extratos com posterior diluição para a realização dos testes, ou seja, foram mais diluídos. O método de preparo do extrato também foi diferente do utilizado em nosso estudo, devido a isso não podemos fazer uma comparação de potencial alelopático.

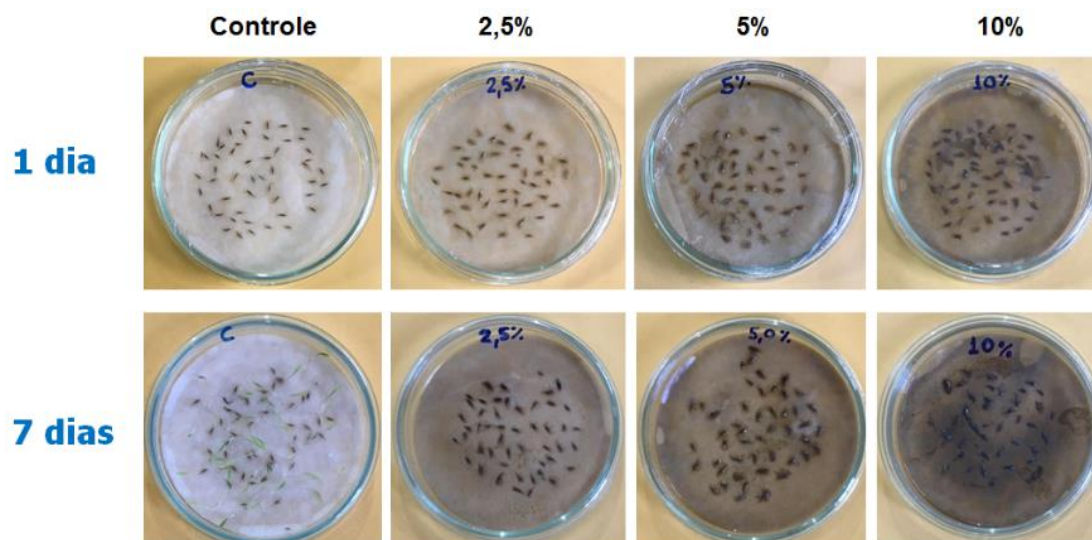


Figura 26 Ensaio para teste de atividade alelopática de extratos de folhas de girassol em diferentes concentrações (0; 2,5; 5 e 10%), sobre a germinação de capim-amargoso.

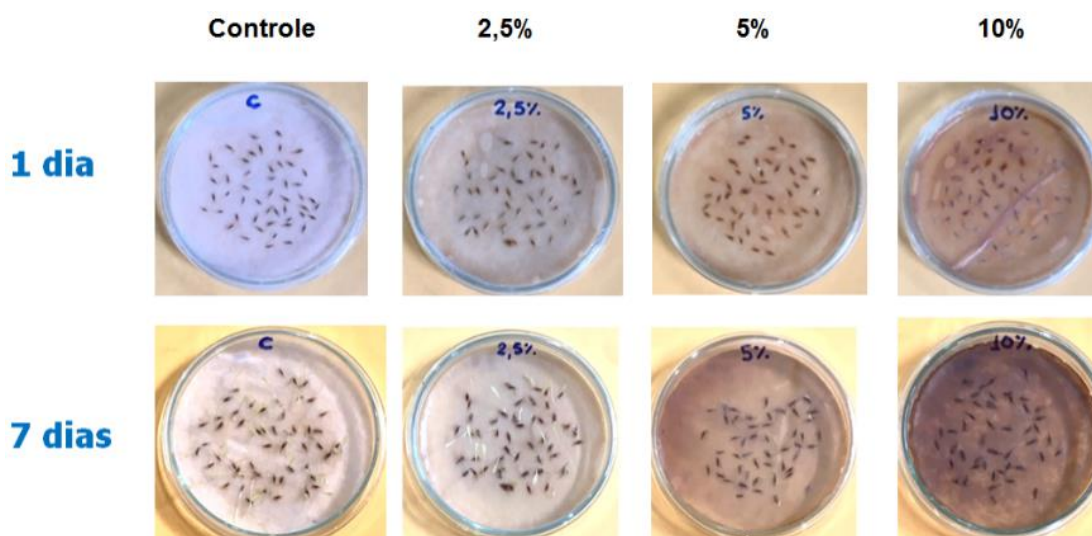


Figura 27 Ensaio para teste de atividade alelopática de extratos de capítulos de girassol em diferentes concentrações (0; 2,5; 5 e 10%), sobre a germinação de capim-amargoso.

Não houve interação significativa entre as doses de extrato no parâmetro de germinação, com ambos os tipos de extrato, portanto não houve ajuste de modelo de regressão. Mas para melhor ilustrar o ocorrido temos na Figura 28 ilustra o gráfico de sobrevivência das sementes, onde é possível notar o efeito inibitório dos extratos, tanto de folha quanto de capítulo, comparado ao controle (zero). Segundo Bogatek; Gniazdowska (2007) os aleloquímicos das folhas de girassol podem gerar um estresse oxidativo nas sementes provocando um desbalanço hormonal que inibe o crescimento das mesmas.

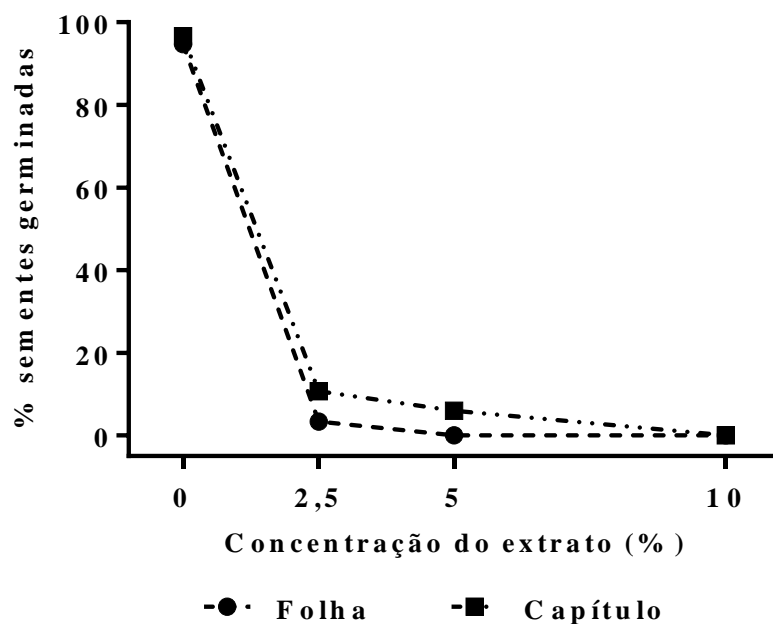


Figura 28 Gráfico de sobrevivência das sementes de capim-amargoso durante 7 dias de tratamento com extratos de folha e capítulos de girassol.

Apesar de não ter ocorrido a inibição completa da germinação nos tratamentos de 2,5 e 5% de capítulo, podemos verificar no gráfico da Figura 29 e na Tabela 9 que houve uma diminuição do índice de velocidade de germinação, ou seja, a constituição química do extrato causa um efeito retardador na germinação das sementes. Esta variável é importante para o estudo alelopático, pois as vezes o efeito fitotóxico não acontece de forma direta na germinação e sim no período em que as sementes levam para germinar (RIGON et al., 2018). Kaya et al. (2013) ao avaliarem a influência de extratos de caule e capítulo de girassol sobre a germinação de sementes de cevada, trigo, lentilha e girassol, observaram o retardamento da germinação das sementes.

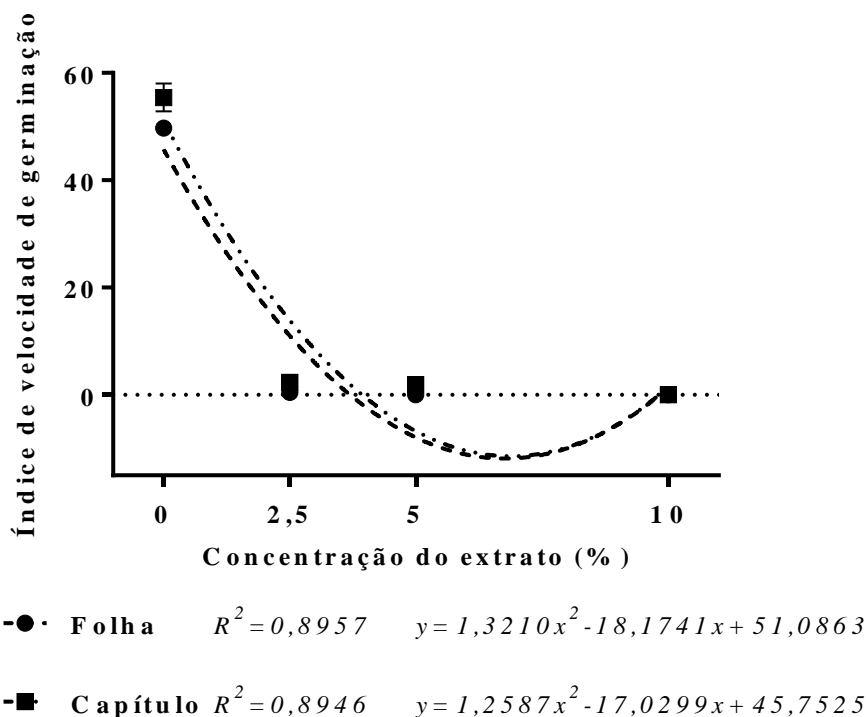


Figura 29 Curvas de regressão do índice de velocidade de germinação das sementes de capim-amargoso tratadas com diferentes doses de extrato aquoso de folha e capítulo de girassol. As barras representam o erro padrão médio das repetições.

Tabela 9 Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de capim-amargoso tratadas com diferentes doses de extrato aquoso de folha e capítulo de girassol.

Índice de velocidade de germinação		
Dose	Folha	Capítulo
0	49,72 B	55,43 A
2,5%	0,47 B	2,32 A
5%	0 B	1,93 A
10%	0 A	0 A

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

6.3.2 Extravasamento de eletrólitos

Ao medir a condutividade do meio é possível estimar a quantidade de eletrólitos extravasados pelas sementes. No gráfico da Figura 29 foi observado um aumento dose-dependente do extravasamento pelas sementes embebidas em extrato foliar, e à medida que é aumentada a concentração do extrato também é aumentado o extravasamento, sugerindo um possível dano na membrana celular. Bogatek et al (2006) correlacionam o

aumento do extravasamento de eletrólitos a danos na integridade da membrana celular, que indicaria a perda na capacidade de manter membranas coerentes, resultando em inibição da germinação.

As sementes tratadas com extrato de capítulo podem ter sofrido menor dano na membrana, não havendo diferença entre as doses iniciais e um salto no extravasamento na maior dose (Figura 29), esse resultado corrobora os dados de germinação em que a dose de 10% foi mais eficaz promovendo 100% de inibição da germinação (Figura 27). Com quatro dias, quase todas as sementes do controle já haviam germinado enquanto que as dos tratamentos não.

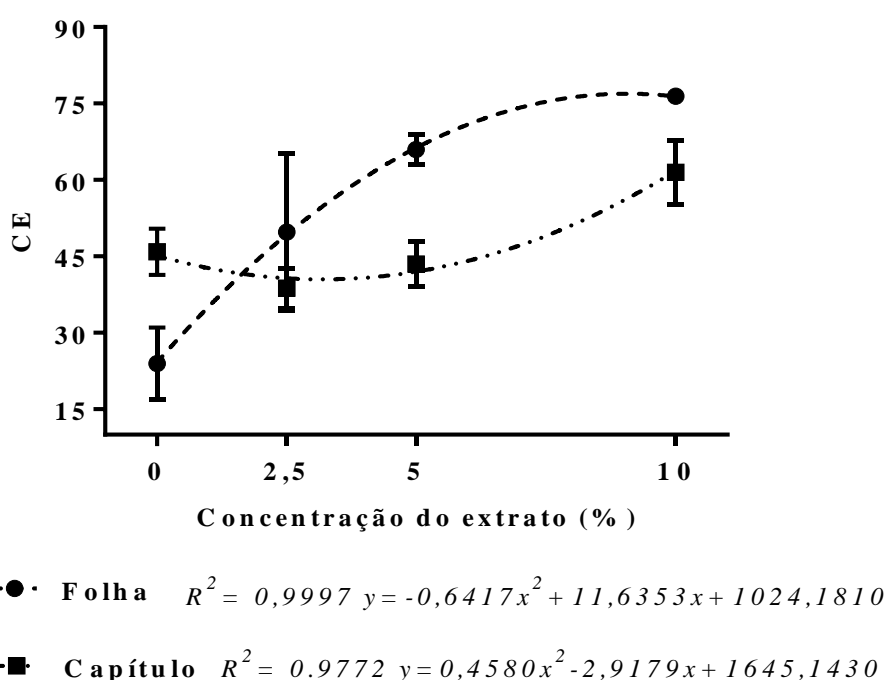


Figura 29 Extravasamento de eletrólitos (CE) das sementes submetidas a diferentes doses de extrato aquoso de folha e capítulo de girassol. As barras representam o erro padrão médio das repetições.

Na comparação entre tipos de extrato (Tabela 10) podemos verificar que as sementes submetidas ao extrato de folha tiveram maior dano na membrana e corroborando os dados de IGV e de % germinação, portanto, este extrato exibiu maior poder de inibição quando comparado ao extrato de capítulo. Rigon et al. (2018), ao trabalharem com extratos aquosos de diferentes órgãos de girassol (raiz, caule e folha), também verificaram atividade alelopática distinta nos tecidos estudados.

O extrato foliar teve maior desempenho alelopático nos parâmetros estudados em

relação ao extrato de capítulo, pois no quesito germinação inibiu 100% da emissão de radículas das sementes de capim amargoso, na análise de IVG teve valores iguais a zero devido a não germinação das sementes e, por fim, na análise de extravasamento de eletrólitos parece causar mais danos à membrana do que o extrato de capítulo.

Os tricomas glandulares, presentes nas folhas do gênero *Helianthus*, secretam metabólitos secundários como mecanismo de defesa contra a herbivoria e instalação de patógenos, dentre estes metabólitos tem-se, por exemplo, os taninos (MASON et al. 2016). Uma hipótese seria que tais substâncias de defesa podem proporcionar maior toxicidade as folhas do girassol e, portanto, causar maior impacto sobre a germinação quando comparado ao capítulo da planta.

Tabela 10 Extravasamento de eletrólitos de sementes e plântulas de capim-amargoso submetidas a diferentes tratamentos com extrato aquoso de folha e capítulo de girassol.

Extravasamento de eletrólitos		
Dose	Folha	Capítulo
0	24b	45,88a
2,5%	49,75a	38,74a
5%	65,95a	43,48b
10%	76,42a	61,52b

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

6.3.3 Análise qualitativa dos extratos por CLAE-DAD

Através das análises do perfil químico dos extratos aquosos por CLAE-DAD, foi possível identificar substâncias fenólicas derivadas do ácido cinâmico, como ácido cafeico e do ácido cafeoilquínico, como ácido clorogênico, 4-cafeoilquínico e 3,4-dicafeoilquínico nos extratos de folha (Figura 30) e de capítulo (Figura 31), as quais podem estar contribuindo para o potencial alelopático dos extratos.

Derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos estão entre aleloquímicos comumente descritos na literatura, e têm sido considerados como fatores primários de alelopatia em ecossistemas florestais (MACIAS et al., 2007). Aparentemente o extrato foliar (Figura 30) parece mais rico em substâncias fenólicas quando comparado ao de capítulo (Figura 31), o que poderia justificar seu maior potencial alelopático.

Alsaadawi et al. (2012) verificaram diferenças de potencial alelopático entre diferentes genótipos de girassol, classificando-os como mais ou menos supressores. Esses

autores, através de análises do perfil químico por CLAE, indicaram a presença de diversos ácidos fenólicos no extrato aquoso dos resíduos de girassol (ácido protocatecuico, ácido isoclorogênico, terpinol, catecol, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vanílico). Essas substâncias são conhecidas por inibir a captação de íons, biossíntese de clorofila, são responsáveis estabilidade da membrana celular, pela biossíntese de proteínas e hormônios e divisão celular, e por alterar os componentes estruturais das células.

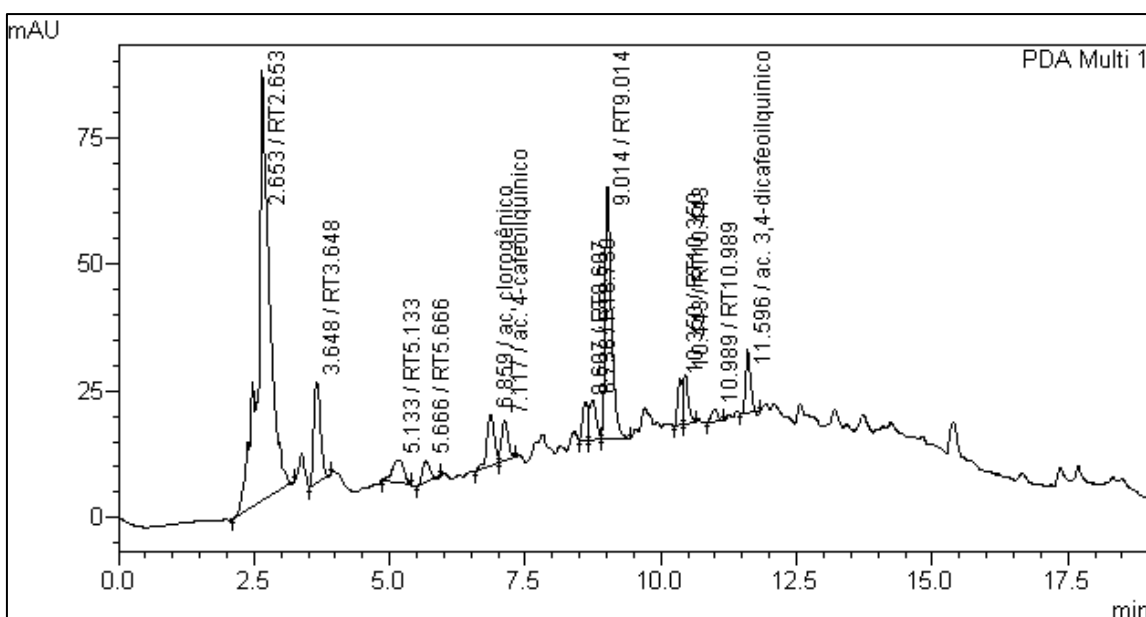


Figura 30 Perfil químico do extrato aquoso de folha por CLAE-DAD.

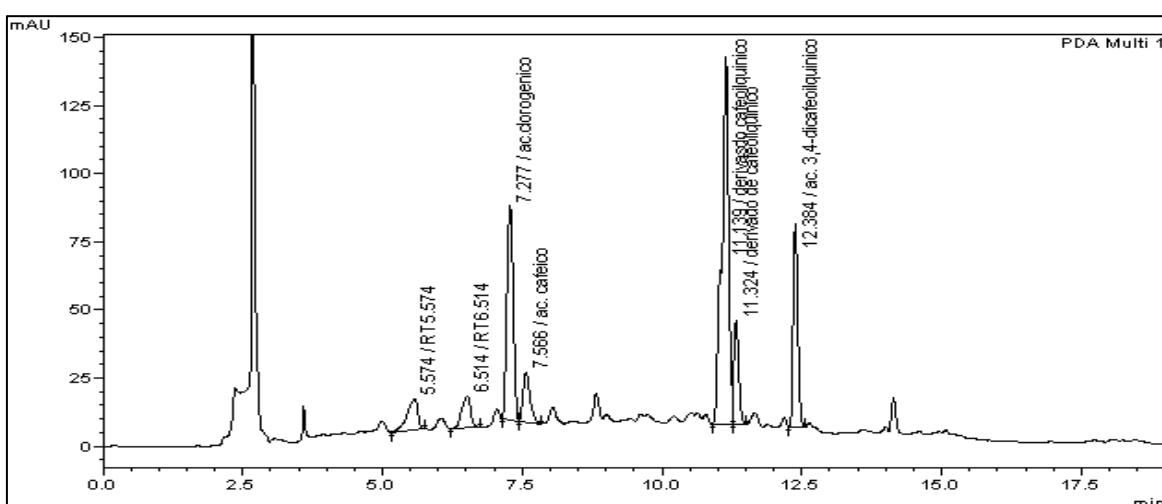


Figura 31 Perfil químico do extrato aquoso de capítulo por CLAE-DAD.

Ao se comparar os perfis químicos dos extratos aquosos de capítulo e folha com sob 2,5 kg.ha⁻¹ de B foi possível observar uma distinção entre eles (Figura 32), confirmando a variação dos metabólitos entre compartimentos das plantas de girassol. É necessário um estudo mais aprofundado para a identificação dos demais substâncias presentes nestes extratos, cujas propriedades podem auxiliar melhor o perfil alelopático dos extratos.

Tem sido demonstrado na literatura que os ácidos fenólicos podem interferir com o funcionamento de várias enzimas, bem como em quase todos os principais processos fisiológicos - atividade de fitormônios, absorção mineral, balanço hídrico de plantas, função estomática, fotossíntese, respiração, síntese orgânica de certos compostos e fluxo de carbono (EINHELLIG, 2004).

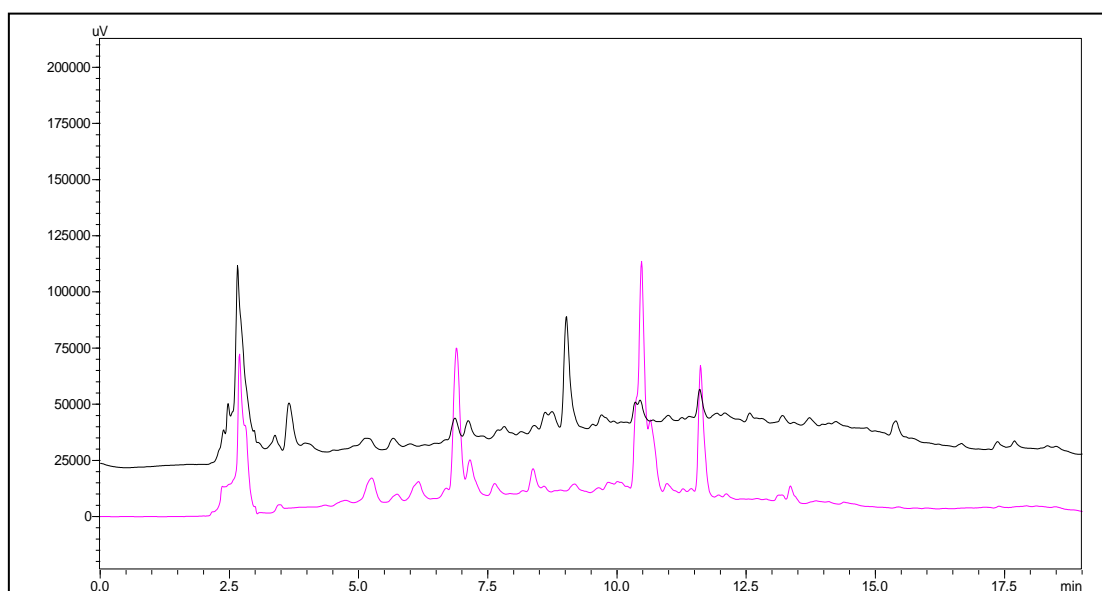


Figura 32 Comparação do perfil químico dos extratos aquosos de capítulo (rosa) e folha (preto) por CLAE-DAD à 280nm

Analisados em conjunto, os dados encontrados neste estudo apontam a folha do genótipo Helio251 como tendo maior potencial alelopático em comparação ao capítulo. Desta forma, há aqui uma indicação de utilização desse extrato para estudos posteriores com objetivo de avaliar o perfil químico de forma quantitativa e mais aprofundada desse extrato a fim de verificar qual ou quais componentes químicos presentes exerceria papel predominante na capacidade alelopática.

Em termos de manejo agrícola e recomendações para o desenvolvimento de estratégias mais favoráveis do ponto de vista ambiental, com vistas à diminuição das

doses e frequência de uso de herbicidas, o genótipo Helio251 passa a ser um potencial candidato a ser utilizado como cultura de entressafra em estratégias de rotação de cultura, pois a incorporação ao solo dos restos de cultivo desse genótipo devem resultar em melhorias tanto das características físico-químicas do solo, quanto no controle de plantas daninhas, como o capim amargoso, por exemplo.

Muhammad; Majeed (2014) testaram os efeitos de extratos de girassol sobre a germinação e crescimento de trigo e milho. Os autores classificaram os efeitos inibitórios dos extratos aquosos na ordem de folha > parte aérea > raiz para ambas as plantas testadas. Alsaadawi et al. (2012) correlacionaram a maior concentração de fitotoxinas (substâncias fenólicas) em girassóis aos genótipos de potencial mais supressivo em comparação com os genótipos menos supressores. Bashir et al (2017) testaram extratos de girassol sobre a germinação de diferentes variedades de trigo e viram que a resposta da cultura à alelopatia varia entre genótipos. Ou seja, mais estudos na área de alelopatia são necessários para testes em campo, pois os girassóis podem apresentar características genotípicas diferenciadas em relação ao potencial alelopático e os genótipos de uma mesma espécie também podem apresentar respostas distintas à alelopatia.

A alelopatia pode ser uma alternativa para o controle de *Digitaria insularis* (capim-amargoso), daninha de grande impacto para agricultura, sendo o girassol uma cultura de grande potencial para esta finalidade, especialmente a partir da utilização de extratos oriundos de suas folhas.

6.3.3 Conclusão parcial

A partir da pesquisa realizada, podemos concluir que a cultura do girassol tem potencial para ser utilizada no controle de capim amargoso. Os testes realizados em extratos de folha e capítulo de girassol demonstraram seu potencial alelopático sobre a germinação desta daninha. Foi constatado que o extrato foliar é mais eficaz ao inibir 100% da germinação em todos os tratamentos, enquanto que o extrato de capítulo apresenta uma característica de ação dose dependente, com eficácia maior na aplicação de alta dose de extrato.

Através da análise de extravasamento de eletrólitos, foi verificado que os dois tipos de extrato alteram a permeabilidade da membrana. É possível que o extrato possua ação pro-oxidante, não obstante não haver uma investigação mais aprofundada no tema. Ainda, pode-se ressaltar que o extrato foliar possivelmente causa maior dano de

membrana, como consequência dos maiores níveis de eletrólitos extravasados (CE) quando este é aplicado.

Por fim, o potencial alelopático da cultura do girassol deve ser avaliado com maior acurácia através de estudos adicionais para aplicação agrônômica em larga escala. Ainda assim, esta pesquisa demonstra que é possível que o girassol possa ser utilizado em sistemas de rotação de culturas como estratégia para o controle de plantas daninhas, através da incorporação de resíduos da cultura ao solo. Vale ressaltar que os resultados desta pesquisa foram positivos para o genótipo Helio251 e que pode haver alterações entre a potencialidade alelopática para outros genótipos.

7 CONCLUSÕES

Através do experimento de campo foi evidente as oscilações de doses adequadas para o melhor rendimento da cultura, devido as diferenças genótípicas em resposta ao elemento. Com destaque para o genótipo BRS323 como mais eficiente na absorção de B e produtividade de grãos em ambientes com baixa disponibilidade desse nutriente. Este genótipo pode ser promissor em estudos biomoleculares sobre a absorção de B em ambientes escassos deste nutriente. O Helio251 com os maiores teores de ácido linoleico e melhor produtividade e teor de óleo na dose aplicada de 5 kg.ha⁻¹, e o BRS324 não teve a produtividade de grãos afetada, mas ocorreu o aumento do teor de óleo quando aplicado o boro como micronutriente.

Os extratos aquosos de folha e capítulo de girassol do genótipo Helio251 demonstraram capacidade antioxidante tanto para os testes químicos quanto para a análise *in vivo* sobre o modelo eucariótico *S. cerevisiae*. Esses dados foram corroborados através de análises de CLAE-DAD que identificou substâncias com alto potencial antioxidante, como o ácido clorogênico, ácido 4-cafeoilquínico e o ácido 3,4-dicafeoilquínico. Entretanto, ficou claro, através das determinações químicas que há outras substâncias, além das fenólicas, que proporcionam esta característica antioxidante aos extratos.

Também foi constatado que os extratos aquosos de folhas e capítulos apresentam potencial alelopático, sendo o extrato foliar mais potente, inibindo 100% da germinação de *Digitaria insularis* em baixas concentrações de extrato, e o extrato de capítulo mostrou-se dose-dependente.

8 REFERÊNCIAS

- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J. MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant properties and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, 101: 1383-1392, 2007.
- ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ALSAADAWI, I. S., SARBOUT, A. K., & AL-SHAMMA, L. M. Differential allelopathic potential of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes on weeds and wheat (*Triticum aestivum* L.) crop. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 58, n. 10, p. 1139-1148, 2012.
- ALVES, F. V.; JUNIOR, A. S.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C. M. Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica. **Journal of Seed Science**, v. 34, n. 3, 2012.
- ALVES, L. S., STARK, E. M. L. M., ZONTA, E., FERNANDES, M. S., SANTOS, A. M. D.; SOUZA, S. R. Different nitrogen and boron levels influence the grain production and oil content of a sunflower cultivar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 1, p. 59-66, 2017.
- ALVES, L.S. **Cinética de absorção de nitrato e amônio e produção de grãos e óleo de girassol em diferentes níveis de nitrogênio e boro.** (2014). 35f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
- ANJUM, T.; BAJWA, R. Field appraisal of herbicide potential of sunflower leaf extract against *Rumex dentatus*. **Field Crops Research**, v. 100, p. 139–142, 2007.
- ASHRAFI, Z.Y., SADEGHI, S., MASHHADI, H.R. AND HASSAN, M.A. (2008). Allelopathic Effects of sunflower (*Helianthus annuus*) on Germination and Growth of Wild Barley (*Hordeum spontaneum*). **Journal of Agricultural Technology**, v.4, n.1, p. 219-229.
- ATAMIAN, H. S.; CREUX, N. M.; BROWN, E. A.; GARNER, A. G.; BLACKMAN, B. K.; HARMER, S. L. Circadian regulation of sunflower heliotropism, floral orientation, and pollinator visits. **Science**, v. 353, n. 6299, p. 587-590, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BASHIR, T.; ZAHARA, K., HAIDER, S.; TABASSUM, S. Chemistry, pharmacology and ethnomedicinal uses of *Helianthus annuus* (sunflower): a review. **Pure and Applied Biology**, v. 4, n. 2, p. 226, 2015.

- BASHIR, U.; JAVAID, A.; BAJWA, R. Allelopathic effects of sunflower residue on growth of rice and subsequent wheat crop. **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 3, p. 326, 2012.
- BASHIR, U.; JAVAID, A.; BAJWA, R. Effects of aqueous extracts of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on germination of seedling growth on the selected wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 83-92, 2017.
- BATES, P. D.; STYMNE, S.; OHLROGGE, J. Biochemical pathways in seed oil synthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 358-364, 2013.
- BERTONCELJ J, DOBERSEK U, JAMNIK M, GOLOB T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.
- BILGEN, B. B.; EVCI, G.; KAYA, Y. Comparison of different dna markers for selection of high oleic type sunflower genotypes. In: **Science conference**. 2018. p. 146.
- BOGATEK, R. et al. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. **Biologia Plantarum.**, v. 50, n. 1, p. 156-158, 2006.
- BOGATEK, R.; GNIAZDOWSKA, A. ROS and phytohormons in plant-plant allelopathic interaction. **Plant signaling & behavior**, v. 2, n. 4, p. 317-318, 2007.
- BORTOLINI, E.; PAIAO, G. D.; D'ANDRÉA, M. S. C. Estudo da planta de girassol. In: GAZZOLA, Adriano, et al. **A cultura do girassol**. Piracicaba–SP. Junho de, 2012.
- BROWN, P.H.; SHELP, B.J. Boron mobility in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.193, p.85-101, 1997.
- CAGLIARI, A.; MARGIS, R.; MARASCHIN, F.S., et al. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. e10, 2011.
- CALLE-MANZANO, C. L. **Carência de boro em girassol**. Madri: Hojas, 1985.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Girassol: derivados proteicos. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 1994.
- CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; CASTRO, C. de; SILVEIRA, J. M. **Fases de desenvolvimento da planta de girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 24p. (EMBRAPA-CNPSo. Documento, 59).
- CERVILLA L.M.; BLASCO, B.; RIOS J.J.; ROMERO L.; RUIZ J.M. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 747-756, 2007.
- CERVILLA, L. M.; BLASCO, B.; RÍOS, J. J.; ROSALES, M. A.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; Romero, L.; Ruiz, J. M.. Response of nitrogen

metabolism to boron toxicity in tomato plants. **Plant Biology**, v. 11, n. 5, p. 671-677, 2009.

CORSATO, J. M., FORTES, A. M. T., SANTORUM, M., & LESZCZYNSKI, R. Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol sobre a germinação de soja e picão-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 353-360, 2010.

DECHEN, A.R.; NATHTIGALL, G.R., Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p., Viçosa, 2006.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DHILLON, B. S.; SHARMA, P. K.; SHARMA, S. Oil yield and fatty acid profile of staggered sown Spring sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to foliar application of boron and tibia. **Applied Biological Research**, v. 19, n. 2, p. 156-163, 2017.

DURRETT, T.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 593-607, 2008.

EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. 372p. 2004.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z. A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493–506, 2011.

GAZZOLA, A.; FERREIRA JR, C. T. G.; CUNHA, D. A.; *et al.* **A cultura do girassol**. Piracicaba–SP. Junho de, 2012.

GEMELLI, A.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G. B. P.; CAMPOS JUMES, T. M.; OLIVEIRA NETO, A. M.; DAN, H. A.; BIFFE, D. F. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p. 231-240, 2012.

GIADA, M. L. D.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, n. 5, p. 395-401, 2009.

GIADA, M. L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: **Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants**. InTech, 2013.

GUPTA, U. C. Boron. In: BARKER A.V.; PILBEAM, D. J. **Handbook of Plant Nutrition**. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group. , 2007.

- HOSSAIN, M.F., SHENGGANG, P., MEIYANG, D., ZHAOWEN, M., KARBO, M.B., BANO, A., XIANGRU, T. Photosynthesis and antioxidant response to winter rapeseed (*Brassica napus* L.) as affected by boron. **Pak J. Bot.** v. 47, n. 2, p. 675-684, 2015.
- IVANOFF, M. E. A.; UCHÔA, S. C. P.; ALVES, J. M. A.; SMIDERLE, O. J.; SEDIYAMA, T. Formas de aplicação de nitrogênio em três cultivares de girassol na savana de Roraima. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n.3, p.319-325, 2010.
- JABRAN, K. Sunflower allelopathy for weed control. In: **Manipulation of Allelopathic Crops for Weed Control**. Springer, Cham, 2017. p. 77-85.
- JABRAN, K.; FAROOQ, M. Implications of potential allelopathic crops in agricultural systems. In: **Allelopathy**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 349-385.
- JAIN, R.; PATANGRAY, A. J.; RATHORE, A. K.; NAYAK, T. Boron: An important element for agricultural productivity. **Asian Journal of Multidisciplinary Studies**, v. 3, n. 2, 2015.
- JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.
- KARABAL, E; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H.A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 925-933, 2003.
- KAYA, M. D., OZCAN, F., DAY, S., BAYRAMIN, S., AKDOĞAN, G., IPEK, A. Allelopathic Role of Essential Oils in Sunflower Stubble on Germination and Seedling Growth of the Subsequent Crop. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 2, 2013.
- KHAN, I. ANJUM, S. A.; QARDRI, R. W. K.; ALI, M., CHATTHA; M. U.; ASIF, M. Boosting Achene Yield and Yield Related Traits of Sunflower Hybrids through Boron Application Strategies. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 11, p. 1752, 2015.
- KIM, D. S.; HWANG, B. K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 9, p. 2295-2306, 2014.
- KRUDNAK, A.; WONPRASAID, S.; MACHIKOWA, T. Boron affects pollen viability and seed set in sunflowers. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 2, p. 162-166, 2013.
- LAMPE, J. W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3, p. 475s-490s, 1999.
- LANDI, M.; REMORINI, D.; PARDOSI, A.; GUIDI, L. Boron excess affects photosynthesis and antioxidant apparatus of greenhouse Cucurbita pepo and Cucumis sativus. **Journal of plant research**, v. 126, n. 6, p. 775-786, 2013.

- LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 613p.
- LIU, G.; DONG, X.; LIU, L.; WU, L.; PENG, S. A.; JIANG, C. Metabolic profiling reveals altered pattern of central metabolism in navel orange plants as a result of boron deficiency. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 4, p. 513-524, 2015.
- LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J., NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of botany**, v. 78, n. 3, p. 389-398, 1996.
- MACÍAS, F. A., TORRES, A., GALINDO, J. L., VARELA, R. M., ÁLVAREZ, J. A., & MOLINILLO, J. M. Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick®. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 687-692, 2002.
- MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M.; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. Allelopathy—a natural alternative for weed control. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 63, n. 4, p. 327-348, 2007.
- MACÍAS, F. A.; OLIVA, R. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. **Phytochemistry**, v.52, n.4, p. 613-621, 1999.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, jan./feb. 1962. 176-177p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafôs, 308 p, 1997.
- MASON, C. M.; BOWSHER, A. W.; CROWELL, B. L.; CELOY, R. M.; TSAI, C. J.; DONOVAN, L. A. Macroevolution of leaf defenses and secondary metabolites across the genus *Helianthus*. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1720-1733, 2016.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUJMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.
- MEHMOOD, A.; SALEEM, M. F.; TAHIR, M.; SARWAR, M. A.; ABBAS, T.; ZOHAIB, A.; ABBAS, H. T. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth, yield and oil quality response to combined application of nitrogen and boron. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 1, p. 86-97, 2018.
- MEKKI, B. E. N. Effect of boron foliar application on yield and quality of some sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. **Journal of Agricultural Science and Technology B** 5, pp. 309-316, 2015.
- MERCALI, C. A.; HIROTA, B. C. K.; MIYAZAKI, C. M. S.; de LIMA, C. P.; VERDAM, M. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Estudo do perfil fitoquímico,

nutricional e atividades biológicas do broto de girassol (*Helianthus Annuus* L.). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.3, 2012.

METCALFE, L.D. SCHMITZ, A.A. PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MIWA, K.; FUJIWARA, T. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1103-1108, 2010.

MUHAMMAD, Z.; MAJEED, A. B. D. U. L. Allelopathic effects of aqueous extracts of sunflower on wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.). **Pak. J. Bot.**, v. 46, n. 5, p. 1715-1718, 2014.

NACHIANGMAI, D., DELL, B., BELL, R., HUANG, L.; RERKASEM, B. Enhanced boron transport into the ear of wheat as a mechanism for boron efficiency. **Plant and Soil**, v.264, n.1-2, p.141-147, 2004

NIKNEZHAN, P., KARIMMOJENI, H., MOGHANIBASHI, M., & AL SADAT HOSSEINI, N. Allelopathic potential of sunflower on weed management in safflower and wheat. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 11, p. 1434, 2011.

OLIVEIRA, J. S.; PEIXOTO, C.; POELKING, V.; ALMEIDA, A. Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizantha* e *Sorghum bicolor* com potencial alelopático para uso como herbicida natural. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 379-384, 2015.

ORACZ, K.; BAILLY, C.; GNIAZDOWSKA, A.; CÔME, D.; CORBINEAU, F.; BOGATEK, R. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 2, p. 251-264, 2007.

PAJAŹK, P.; SOCHA, R.; GAŁKOWSKA, D.; ROŹNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300-306, 2014.

PANNACCI, E.; PETTOROSSO, D.; TEI, F. Phytotoxic effects of aqueous extracts of sunflower on seed germination and growth of *Sinapis alba* L., *Triticum aestivum* L. and *Lolium multiflorum* Lam. **Allelopathy Journal**, v. 32, n. 1, p. 23, 2013.

PATTANAYAK, S., BEHERA, A. K.; DAS, P.; NAYAK, M. R.; JENA, S. N.; BEHERA, S. Performance of summer sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids under different nutrient management practices in coastal Odisha. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, n. 1, p. 435-440, 2017.

PEDROSA, M. M.; MUZQUIZ, M.; GARCÍA-VALLEJO, C.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; AYET, G.; ROBREDO, L. M. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 459-464, 2000.

- PESTANA, J.; CUNHA, D. A.; PRIMIANO, I.V. Introdução ao agronegócio do girassol. In: GAZZOLA, Adriano, et al. **A cultura do girassol**. Piracicaba–SP. Junho de, 2012.
- POWER, P. P; WOODS, W. G. The chemistry of boron and its speciation in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, n. 1/2, p. 1-14, jun. 1997.
- PRATS, E.; GALINDO, J. C.; BAZZALO, M. E.; LEÓN, A.; MACÍAS, F. A.; RUBIALES, D.; JORRÍN, J. V. Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 12, p. 2245-2253, 2007.
- PRATS, E; BAZZALO, M. E.; LEÓN, A.; JORRÍN, J. V. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica**, v. 132, n. 3, p. 321-329, 2003.
- PRINCI, M.P.; LUPINI, A.; ARANITI, F.; LONGO, C.; MAUCERI, A.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M. R. (2016). Boron toxicity and tolerance in plants: recent advances and future perspectives. In: A. Parvaiz (Ed.), **Metal Plant Interaction – Emerging Remediation Techniques**. Elsevier, Amsterdam, pp. 115-147.
- PRUDÊNCIO, E. R. **Estudo do potencial antioxidante de diferentes classes de moléculas isoladas de mel e própolis em células de Saccharomyces cerevisiae**. 2016. 86p. Dissertação. (Mestrado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.
- RAMOS, M. J; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v.100, n.1, 261-268, 2009.
- RAMOS, S. J.; FAQUIN, V., FERREIRA, R. M. A.; ARAÚJO, J. L.; CARVALHO, J. G. Crescimento e teores de boro em plantas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) cultivadas em dois latossolos sob influência de doses de boro e disponibilidade de água. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, 2009.
- RIGON, C. A. G.; SALAMONI, A. T.; DE AGUIAR, A. C. M.; CUTTI, L. Allelopathic effect of aqueous extracts of different organs of three sunflower cultivars on germination of radish. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, 2018.
- RUFINO, M, S, M.; ALVES, R, E.; BRITO, E, S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺ **Comunicado técnico online 128**. ISSN 1679-6535, 2007.
- SALAS, J. J.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; HARWOOD, J. L.; et al. Biochemistry of high stearic sunflower, a new source of saturated fats. **Progress in Lipid Research**. v. 55, p. 30-42, 2014.
- SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, Á. R. D. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, vol. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHNEITER, A. A.; MILLER, J.F. Description of sunflower growth stages. **Crop Sci.**, v.21, p.901-903, 1981.

SETH, K.; AERY, N. C. Boron induced changes in biochemical constituents, enzymatic activities, and growth performance of wheat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 11, p. 244, 2017.

SHEKHAWAT, K.; SHIVAY, Y. S. Effect of nitrogen sources, sulphur and boron levels on productivity, nutrient uptake and quality of sunflower (*Helianthus annuus*). **Indian Journal of Agronomy**, v. 53, n. 2, p. 129, 2008.

SHETTY, K.; MCCUE, P. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. **Food Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 67-97, 2003.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SOUZA, A.; OLIVEIRA, M. F.; CASTIGLIONI, V. B. R. O boro na cultura do girassol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 27-34, 2004.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

SYTAR, O.; HEMMERICH, I.; ZIVCAK, M.; RAUH, C.; BRESTIC, M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.25, p.631–641, 2018.

TAHIR, M.; YOUNAS-ISHAQ, M.; SHEIKH, A. A.; NAEEM, M.; REHMAN, A. Effect of boron on yield and quality of sunflower under agro-ecological conditions of Faisalabad (Pakistan). **Scientia Agriculturae**, v. 7, n. 1, p. 19-24, 2014.

TAHIR, M; ASHRAF, S.; IBRAHIM, M. Effect of Foliar Application of Boron on Yield and Quality of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Crop & Environment**, v. 4, n. 1, p. 23-27, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** 5ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TRONCOSO-PONCE, M.A.; RIVOAL, J.; DORION, S.; MOISAN, M.C.; GARCÉS, R. e MARTÍNEZ-FORCE, E. Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) hexokinase associated with seed storage compounds accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.299–308, 2011.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VARSHNEY, P.; FARIDUDDIN, Q.; MOHAMMAD, Y. Boron induced modulation in growth, photosynthesis and antioxidant system in two varieties of *Brassica juncea*. **Int. J. Adv. Res.**, v. 3, n. 10, p. 819-832, 2015.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 758-765, 2009.

WESELAKE, R. J.; TAYLOR, D. C.; RAHMAN, M. H.; SHAH, S.; LAROCHE, A.; MCVETTY, P. B.; HARWOOD, J. L. Increasing the flow of carbon into seed oil. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 866-878, 2009.