

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Caryocar brasiliense* CAMB. (PEQUI) NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA RAIZ EM SEMENTES DE *Panicum maximum*

EVALUATION OF THE ALLELOPATHY POTENTIAL OF METANOLIC EXTRACT GOTTEN FROM OF *Caryocar brasiliense* CAMB. (PEQUI) ON DEVELOPMENT INHIBITION OF ROOT IN SEEDS OF *Panicum maximum*

**Patrícia Flávia Silva Dias MOREIRA¹; Danilo Rodrigues de SOUZA²;
Manuel Gonzalo Hernandez TERRONES³**

1. MSc. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. patricafsdm@hotmail.com; 2. Professor, MSc., Universidade Federal da Bahia - UFBA, Instituto de Ciências Ambientais Desenvolvimento Sustentável – ICADS; 3. Professor, Doutor, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: No presente trabalho foi estudado o potencial alelopático do extrato metanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) com o propósito de avaliar sua eficiência em relação a inibição na germinação de sementes de *Panicum maximum*. Foi obtido o extrato bruto das folhas e, o mesmo, foi sucessivamente fracionado por cromatografia em coluna usando solventes com diferentes polaridades. Foram realizados testes de germinação utilizando soluções dos extratos em diferentes concentrações com fotoperíodo de 10 hs por 7 dias. Os resultados comprovaram a ação inibitória dos extratos em diferentes concentrações sobre a germinação de sementes de *Panicum maximum*, com valores de inibição variando de 50 % até 75% utilizando o extrator diclorometano. Desta forma, confirmou-se um potencial alelopático satisfatório do extrato metanólico das folhas de pequi.

PALAVRAS-CHAVE: Alelopatia. Pequi. Herbicidas naturais.

INTRODUÇÃO

Em muitas culturas, as ervas daninhas representam um grande problema para as plantas alimentares. Estas ervas disputam com as culturas alimentares os elementos nutritivos, a água, os raios solares e o espaço. As culturas invadidas por ervas daninhas crescem mal e por vezes morrem (FAO). A presença de ervas daninhas em áreas cultivadas influencia o crescimento e o desenvolvimento das raízes da cultura, interferindo, por consequência, na utilização dos recursos do solo. Ocorrerá competição entre plantas, tanto por água quanto por nutrientes, quando houver sobreposição na zona de depleção das raízes da cultura e das ervas (RIZZARDI et al, 2001). Normalmente as gramíneas do gênero *Panicum* possuem sistema radicular bem desenvolvido, o que lhe confere ótima resistência e boa sobrevivência em diversas situações, competindo com a cultura implantada (VILELA, 2007). É considerada infestante em mais de vinte tipos de culturas. O controle das infestações por ervas daninhas tem sido feito com o uso de herbicidas sintéticos, agrotóxicos (venenos) que deixam resíduos nos alimentos podendo comprometer a saúde pública (KISSMANN, 1997).

A alelopatia ocorre através de interações bioquímicas, tanto inibitórias como estimulatórias,

entre todos os tipos de plantas. A acumulação de substâncias com efeitos alelopáticos tem sido verificada em todos os órgãos vegetais, havendo uma tendência de acúmulo nas folhas, sendo que a liberação desses compostos pode ocorrer por exsudação radicular, lixiviação ou volatilização (RICE et al., 1984). A Sociedade Internacional de Alelopatia define a Alelopatia como: “A ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento ou inibição de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos” (PINTO et al, 2002).

Aparentemente a maioria dos compostos orgânicos são inibidores em altas concentrações e estimulatórios para o mesmo processo em pequenas concentrações (RICE et al., 1984). Os aloquímicos são introduzidos no meio-ambiente com um vasto número de outros metabólitos secundários como misturas e é provável que efeitos sinérgicos aumentem as atividades observadas (PUTNAM et al., 1986). O efeito sinérgico é um dos grandes responsáveis, em alguns casos, do elevado potencial de inibição, isto é confirmado porque à medida que se fraciona um extrato o poder de inibição decresce pela separação dos compostos alelopáticos. Presentes em todos os seres vivos, as substâncias

alelopáticas são encontradas em maior quantidade e diversidade nas plantas. Distribuem-se por todos os seus órgãos de maneira não uniforme, mas geralmente a concentração é maior na epiderme das folhas e nas raízes (OLIVEIRA, GILBERT, MORS, 1968). A função principal das substâncias alelopáticas é a proteção dos organismos que as produzem. Pode ocorrer tanto a auto-inibição como a inibição de outras espécies.

O emprego prático da alelopatia pode ou não levar ao controle total de espécies prejudiciais, sejam elas fungos, insetos ou ervas daninhas. A ação dos produtos secundários é essencialmente inibidora, reduzindo populações ou afetando o desenvolvimento e o vigor dos organismos atingidos. No entanto, se esta inibição ajudar a manter o equilíbrio biológico das espécies, sem causar dano às culturas ou ao meio ambiente, estará sendo atingido o almejado objetivo ecológico (OLIVEIRA, et al, 1968).

O extrato etanólico das folhas apresentou atividade contra o sarcoma 180 que é um tipo de câncer de pele (OLIVEIRA, GILBERT, MORS, 1968).

Visando minimizar o uso de agrotóxicos no controle das gramíneas do gênero *Panicum*, pesquisou-se a utilização do extrato metanólico das folhas de pequi com o objetivo de comprovar o seu potencial alelopático, avaliando o seu efeito inibitório na germinação, desenvolvimento da raiz e parte aérea da gramínea.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração do extrato bruto

A obtenção do extrato bruto foi feita no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Química da Madeira do Instituto de Química da UFU. Foram utilizadas folhas inteiras do Pequi, secas à sombra, picotadas e trituradas até se obter um pó finamente dividido. Aproximadamente 4,5

Kg de folhas trituradas foram submersas em um recipiente contendo 5,0 L de metanol descansando durante sete dias. A solução foi filtrada para se obter o extrato. Para remoção da clorofila foi adicionado ao extrato carvão ativo, sendo que a solução foi submetida a nova filtração com uma camada de 1 cm de celite em um funil de porcelana. O extrato obtido foi concentrado com o auxílio de um evaporador rotativo à temperatura de 40 °C.

Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto das folhas de pequi foi filtrado em uma coluna preenchida com cerca de 75% de sílica branca para cromatografia e 25% de sílica incorporada ao extrato bruto. Foi passada a seguinte seqüência de solventes para a filtração: n-hexano, diclorometano, Acetato de Etila: Acetato de Etila: Metanol (70:30), Acetato de Etila: Metanol (50:50), Acetato de Etila: Metanol (30:70), Metanol.

As mudanças de solventes foram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência de extração. As frações filtradas foram concentradas no evaporador rotativo a 40°C. Em seguida, foram submetidas ao ensaio de germinação. As frações que apresentaram maior porcentagem de inibição sobre as sementes de *Panicum maximum* foram fracionadas. Montaram-se duas colunas de adsorção correspondentes as frações provenientes dos solventes diclorometano e metanol.

Fração em diclorometano: A fração proveniente do solvente diclorometano foi incorporada em sílica com o próprio solvente e macerada com um cadinho de porcelana. A coluna foi empacotada e em seguida, a sílica incorporada com extrato foi acrescida à coluna cerca de 10 cm de altura e aguardou a sedimentação. Foi passada a primeira mistura de solventes na coluna para o início da cromatografia. O solvente foi sendo adicionado até a cor da sub-fração não se alterar. De acordo com a tabela 1 a seqüência de solventes é apresentada na Tabela 1:

Tabela 1. Mistura de solventes das sub-frações da coluna de Diclorometano

Sub-frações	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila
1	25	50	25
2	10	80	10
3	20	80	--
4	--	80	20
5	5	90	5
6	--	100	--
7	--	50	50

Ensaio de germinação

No Laboratório de Análise de Sementes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia realizaram-se os ensaios de germinação. Foram utilizadas sementes da planta *Panicum maximum* em placas GermBox. As sementes foram tratadas com uma solução dos extratos e respectivas frações em variadas concentrações. Cada placa Germbox com a dimensão de 11x11 cm foi esterilizada com uma solução de hipoclorito, formol a 30% e água. Após enxágüe com água comum e em seguida água destilada (para eliminar resíduos) a placa foi forrada com um papel de filtro previamente esterilizado para evitar a formação de fungos. Em seguida, 15 de cada solução aquosa do extrato e respectivas frações foram adicionadas dentro das respectivas placas identificadas com suas devidas concentrações (variando de 0 a 200 ppm) e, com a pinça metálica, distribuiu-se 20 sementes de *Panicum maximum* (capim-colonião) em cada germbox (totalizando 27 placas). As placas para cada ensaio foram colocadas

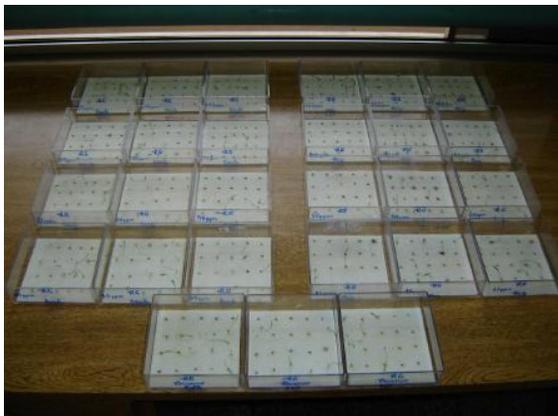


Figura 1. Placas de germinação e coleta de resultados

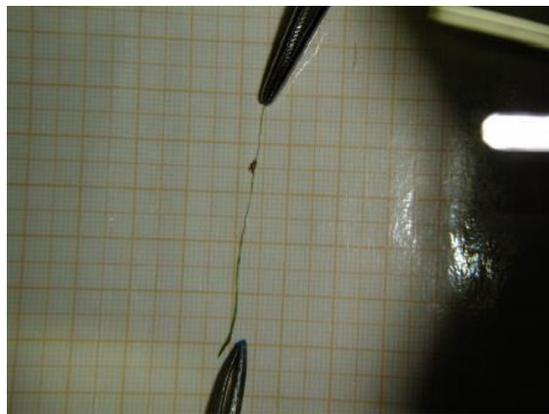
Determinado o potencial de inibição correspondente a cada fração do extrato bruto, as frações foram submetidas ao fracionamento. O bioensaio foi repetido para os testes com as respectivas sub-frações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste biológico utilizado para comprovar a atividade de compostos aleloquímicos foi o estudo sobre o crescimento da raiz após a germinação das sementes. As placas (GermBox) de todos os ensaios foram avaliadas e medidas levando em consideração dois princípios: 1) que as sementes germinadas são as que apresentam emergência da radícula (DUDAI et al, 1999; ALVES et al, 2004) e 2) que a inibição mínima de 50,00% da germinação é um padrão

na câmara germinadora a uma temperatura de 25°C e lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 10 horas por sete dias. Durante esse período não houve necessidade de reumidecer os substratos. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração de extrato.

A germinação foi monitorada com a amostra de referência que se constitui em uma placa preparada com um papel de filtro esterilizado, com 20 sementes e 15 mL de água destilada. As medidas foram realizadas com uma lupa acoplada a um papel milimetrado onde se determinou tamanho da raiz de todas as sementes germinadas de cada placa para obtenção dos resultados ao final do sétimo dia, como pode ser visto na Figura 1. As medidas foram realizadas individualmente por placa. A triplicata permitiu uma maior confiabilidade no procedimento. Determinado o potencial de inibição correspondente a cada fração do extrato bruto, as frações foram submetidas ao fracionamento. O bioensaio foi repetido para os testes com as respectivas sub-frações.



satisfatório para avaliar as potencialidades alelopáticas de um extrato (SOUZA FILHO et al, 2006, SOUZA et al, 2005, BORGES et al, 2007).

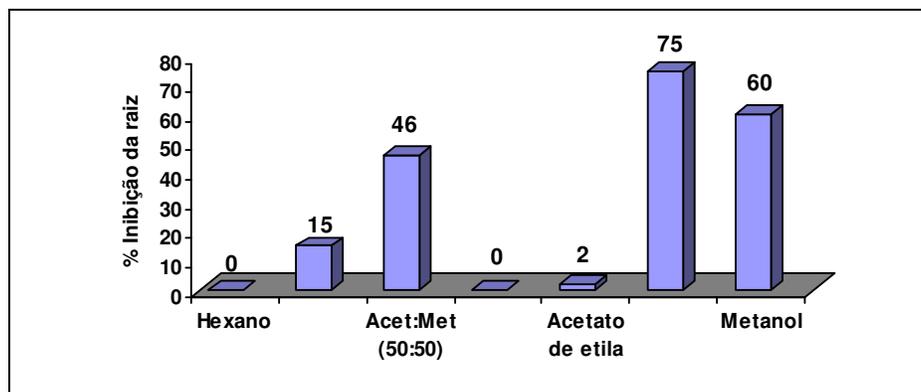
No primeiro ensaio de germinação realizado com o extrato bruto, o propósito foi de verificar se este extrato tem a propriedade de inibir o crescimento, da raiz das sementes de *Panicum maximum*. Quando um solvente de transferência é necessário para compostos com solubilidade moderada, a acetona e o dimetilsulfóxido (DMSO) têm sido usados com sucesso. Para o preparo das soluções, a fim de se realizar o ensaio de germinação, foi necessário em algumas sub-frações a diluição no solvente DMSO ao invés do solvente extrator de origem (MELO, GONÇALVES, 2001). A tabela a seguir demonstra os resultados obtidos com o extrato bruto.

Tabela 2. Porcentagem de inibição do crescimento da raiz das sementes de *Panicum maximum* pelo extrato bruto metanólico das folhas de pequi

Soluções aquosas – Extrato bruto (ppm)	% Inibição raiz
0	0
25	4
50	23
100	35
150	56

A partir da Tabela 2 foi observado que na concentração máxima da solução aquosa do extrato metanólico bruto (150 ppm), a porcentagem de inibição da raiz apresentada foi de 56%. A inibição da raiz foi considerada satisfatória para verificar a existência do potencial fitotóxico. Para fins de estudo e aplicação prática, foram utilizadas concentrações máximas de 150 ppm.

Com relação ao fracionamento de extrato bruto em diferentes solventes não se obteve fração proveniente da eluição pelo hexano. Os demais solventes tiveram um bom arraste gerando 5 frações. A Figura 2 compara os resultados das porcentagens de inibição da raiz relativas a cada fração obtida por cromatografia em coluna.

**Figura 2.** Resultados comparativos de inibição da raiz com os extratos provenientes de cada um dos solventes utilizados durante o fracionamento do extrato bruto.

A sensibilidade dos efeitos alelopáticos inibitórios na germinação de *Panicum maximum* ocorreu na ordem decrescente: diclorometano >

metanol > acetato de etila:metanol (50:50) > acetato de etila:metanol (70:30) > acetato de Etila > Hexano > acetato de etila:metanol (30:70) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de inibição na raiz das sementes de *Panicum maximum* pela fração dos solventes diclorometano e metanol

Concentração das soluções aquosas (ppm)	% Inibição raiz Fração diclorometano	% Inibição raiz Fração metanol
0	0	0
150	63	60
200	75	58

Partindo desses resultados, optou-se em sub-fraционar a fração proveniente do solvente de diclorometano por apresentar melhores resultados. Visto que nas concentrações de 150 e 200 ppm para a fração metanol a porcentagem de inibição da raiz foi praticamente a mesma. Foi passada pela coluna

da fração extraída pelo diclorometano o mesmo conjunto de solventes utilizado no fracionamento do extrato bruto. Foram obtidas 7 sub-frações. A Figura 3 mostra os resultados obtidos de cada sub-fração na porcentagem de inibição da raiz.

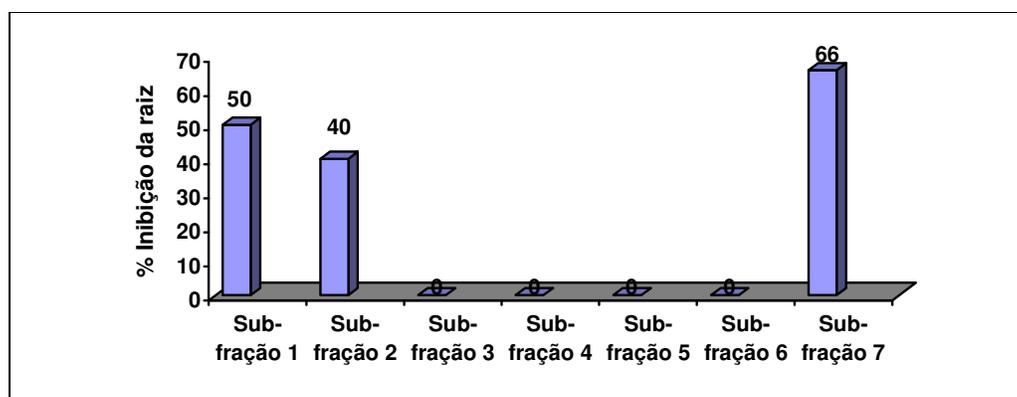


Figura 3. Inibição das sub-frações obtidas pelo fracionamento da coluna da fração diclorometano.

Após o ensaio de germinação, os melhores resultados apresentados foram das subfrações 1 (50%) e 7 (66%), que correspondem às obtidas

usando as misturas: Diclorometano/Acetato de Etila (50:50) e Diclorometano/ Acetato de Etila/ Hexano (50:25: 25), apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de inibição na raiz das sementes de *Panicum maximum* pela sub-fração Diclorometano/Acetato de Etila (50:50) e Diclorometano/Acetato de Etila/ n-hexano(50:25:50)

Soluções aquosas (ppm)	% Inibição raiz	
	Sub-fração Diclorometano/Acetato de Etila (ppm)	Sub-fração Diclorometano/Acetato de Etila/ n-hexano (ppm)
0	0	0
100	62	40
150	66	52

As soluções de 100 e 150 ppm da sub-fração Diclorometano:Acetato de etila (50:50) tiveram um efeito muito semelhante na porcentagem de inibição neste ensaio (cerca de 60%). A sub-fração relativa ao arraste pela mistura Diclorometano /Acetato de etila /Hexano (50:25:25) não apresentou resultados tão significativos mas foi tido em consideração pelo fato de estar acima de 50% na concentração de 150 ppm.

Considerando os valores de inibição do extrato obtido utilizando como solvente diclorometano, mostrados na figura 2 e os valores obtidos das sub-frações de diclorometano/acetato de etila (50:50) e diclorometano/acetato de etila/n-hexano (50:25:25) mostrados na figura 3, verifica-se um comportamento sinérgico dos componentes do extrato pelo diclorometano, pois, quando sub-fractionado o potencial inibitório das sub-frações de diclorometano/ acetato de etila (50:50) e diclorometano/ acetato de etila/ n-hexano (50:25:25) apresentou resultados inferiores aos provenientes do extrato da fração do solvente diclorometano.

Este estudo permitiu verificar o potencial alelopático do extrato metanólico das folhas de

Caryocar brasiliense camb. (pequi). Isto mostra o potencial uso desse extrato como fonte de produtos naturais herbicidas como aplicação alternativa aos comerciais, porém com melhor seletividade e menor impacto ambiental. O fracionamento cromatográfico do extrato bruto usando solventes n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, concluiu que as frações obtidas usando diclorometano e metanol apresentaram maior atividade inibitória no crescimento da raiz de *Panicum maximum* (capim-colonião). Através dos resultados de germinação comprovou-se que o efeito sinérgico causado pela mistura desses compostos foram responsáveis pela atividade inibitória. O fracionamento seguinte não demonstrou inibição satisfatória, mostrando que a separação de tais compostos não promove resultados acima de 50% como o da fração anterior. Estudos paralelos vêm sendo feitos a fim de provar a capacidade alelopática de outras partes do pequi, como caule e raízes. Até o momento, a maior atividade encontrada foi através do extrato das folhas do pequi.

ABSTRACT: The allelopathic potential of the methanolic extract of pequi leaves was studied in this work in order to evaluate its efficiency in relation to the germination inhibition of *Panicum maximum* seeds and the posterior characterization of the allelopathic compounds responsible for this inhibition. It was performed the concentration of the whole extract of leaves and its successive fractioning in several solvents with different polarities. Germination tests were using the extract solutions in different concentrations performed in a photoperiod of 10 h for 7 days. The results proved out the inhibitory action of the extracts in different concentrations over the germination of *Panicum maximum* seeds, with inhibition values ranging from 50% to 90%. The concentration with best results was 150 ppm.

KEYWORDS: Allelopathy. Pequi. Natural herbicide.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B.; Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, nov. 2004.
- BORGES, F. C.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J. C.; OLIVEIRA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S.; Potencial alelopático de duas neolignanais isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae); **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 51-59, jan./mar. 2007.
- DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A. M.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. R.; Essential Oils as Allelochemicals and Their Potential Use as Bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079-1089, 1999.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; Ficha de informação 10: luta contra ervas daninhas e pragas, disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/x3996p/x3996p0m.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2007.
- KISSMANN, K. G.; **Plantas infestantes e nocivas**; São Paulo: BASF, 1997. 825 p.
- MELO, J. T.; GONÇALVES, A. N. Inibidores de germinação em frutos e sementes de pequi, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Cerrados**, Brasília: Embrapa Cerrados, n. 23, 2001.
- OLIVEIRA, M. M.; GILBERT, B; MORS, W. B.; Triterpenes in Caryocar Brasiliense, In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1968, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 451-452. 1968.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifaneo, R. A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PUTNAM, A. R.; TANG, C. H.; Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems, In: _____, **The Science of Allelopathy**; New York: Wiley, p. 1-22, 1986.
- RICE, E. L.; In: _____ **Allelopathy**; 2. ed., New York: Academic, 1984, 291 p.
- RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A.; JR., A.M.; AGOSTINETTO, D.; Competição por recursos do solo entre ervas daninhas e culturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, jul./ago. 2001, p. 707-714.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*, **Planta Daninha**; Viçosa, v. 24, n. 4, out./dez. 2006.
- SOUZA, S. A. M.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; PIANA, C. F. B.; BOBROWSKI, V. L.; VILELA, H, **Série gramíneas tropicais - gênero panicum (*panicum maximum* – colônio capim)**, Disponível em: <http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/artigos_gramineas_tropicais_panicum_green.htm>. Acesso em 27 jul. 2007.