

ESTUDO DO POTENCIAL ALELOPATICO DO EXTRATO METANOLICO DE RAIZ E CAULE DE *Caryocar brasiliense* Camb. (PEQUI)

STUDY ALLELOPATHIC EFFECTS OF METHANOL EXTRACTS OF ROOT AND STEM OF *Caryocar brasiliense* Camb. (PEQUI)

Gláucia Aparecida Andrade REZENDE¹; Manuel Gonzalo Hernandez TERRONES²; Douglas Messias Lamounier Camargos REZENDE³

1. MSc. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. gaucidal@yahoo.com.br; 2. Professor, Doutor, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Professor, MSc., Faculdade Santa Rita de Cássia, Itumbiara, GO, Brasil.

RESUMO: Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a ação herbicida dos extratos metanólicos de caule e raiz de *Caryocar brasiliense*, popularmente conhecido como pequi, em ensaios de germinação de sementes de *Panicum maximum*, uma planta daninha monocotiledônea conhecida por capim-colonião, analisando sua germinação, alongação do caule e da raiz. Os dois extratos testados apresentaram potenciais herbicidas, onde o extrato bruto de raiz de pequi apresentou melhor ação herbicida quando comparado com o extrato bruto de caule. A fração hexânica e as subfrações 8, 11 e 13, extraídas da fração acetato/metanol (7:3) também apresentaram bons potenciais herbicidas. Os testes de reconhecimento de classes de metabólitos secundários revelaram a presença de alcalóides e saponinas na fração hexânica, cumarinas voláteis e saponinas na subfração 8, saponinas e flavonóides e saponinas na subfração 11 e taninos condensáveis e saponinas na subfração 13. A atividade herbicida dos extratos brutos de caule e raiz de pequi, bem como das frações e subfrações estão associadas ao fenômeno de sinergismo entre os compostos presentes nestes.

PALAVRAS-CHAVE: Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Atividade alelopática. Herbicidas alelopáticos.

INTRODUÇÃO

Teoricamente, plantas daninhas e culturas são capazes de produzir compostos químicos que podem influenciar o crescimento e produtividade de plantas vizinhas. As interações planta-planta são a combinação de competição direta por fontes de luz, água, nutriente e alelopatia. (COLEGATE; MOLYNEUX, 1993; IKAN, 1991).

O termo alelopatia foi criado das palavras gregas *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) por Molish, em 1937, e é usado para indicar qualquer efeito causado por um ser vivo de forma benéfica ou prejudicial sobre outro, por meio da liberação de substâncias químicas e/ou produtos secundários por ele elaborados. Os metabólitos secundários, também chamados de substâncias alelopáticas ou aleloquímicos, são compostos químicos de estruturas complexas, de distribuição mais restringida, que são liberados pela planta por intermédio da decomposição de folhas e caules e exsudação direta no solo pelas raízes mediante processos físicos, químicos ou biológicos. (MIZUTANI, 1999; REIGOSA, PEDRO, 2002; ALIOTTA et al., 1994; BAGHESTANI et al., 1999).

Na natureza, estes mecanismos de ataque e defesa entre os seres vivos acontecem concomitantemente, sendo difícil distinguir e identificar os efeitos individuais, devido à

complexidade biológica do processo (RICE, 1984).

O potencial alelopático do extrato bruto da folha de *Tamarindus indica* L. foi investigado através de bioensaios, onde o crescimento radicular e o hipocótilo de trevo branco e grama de celeiro (plantas daninhas) e alface e rabanete (grupo comestível) foram fortemente inibidos, onde quanto maior foi a concentração do extrato, maior a inibição observada. Estes resultados indicam que a folha de tamarindo contém um ou mais aleloquímicos com forte atividade reguladora do crescimento (PARVEZ et al., 2003).

A alelopatia pode ser importante quando uma planta invasora afeta outra espécie ou quando microorganismos não podem competir com uma nova molécula. Ela pode ser efetiva somente quando a planta está em condições de estresse devido a outros mecanismos, tais como as interferências do meio no qual vivem. Nestas condições, a produção de aleloquímicos aumenta (REIGOSA; SÁNCHEZ-MOREIRAS; GONZÁLEZ, 1999).

O efeito do aleloquímico depende do composto químico que é adicionado ao meio ambiente, separando, assim, o fenômeno de alelopatia do de competição. Estes aleloquímicos inibem a certa concentração, mas também estimulam o mesmo processo ao qual atuam, quando em pequenas concentrações.

Outro aspecto da alelopatia é o efeito de sinergia, que é a combinação de atuações de dois ou

mais compostos, ou seja, sua eficácia é maximizada quando estes compostos agem juntos. Se os separarmos, nenhuma atividade poderá ser observada (RICE, 1984).

O estudo sobre alelopatia pode ser complicado de ser realizado. Isto se deve ao fato de na natureza os efeitos alelopáticos entre plantas são difíceis de separar da complexidade das interferências restantes que se estabelecem entre as plantas. Só se pode identificar um fenômeno como sendo alelopático quando se prova que é devido a ações bioquímicas e não a fatores climáticos ou de competição por água, luz ou nutrientes orgânicos e inorgânicos (ALMEIDA, 1988). Esta competição direta por recursos nutricionais, que também causam efeitos inibitórios de uma planta sobre outra, os quais são parecidos com os do fenômeno alelopatia, é definido como interferência entre duas espécies (DUKE; SMEDA; WESTON, 1997).

Soares e Vieira (2000) investigaram a presença alelopática em cinco espécies de *Gleicheniaceae* através de extratos aquosos de frondes senescentes (folhas velhas) sobre a germinação e desenvolvimento radicular de *Lactuca sativa* L. (alface) e concluiu que a toxidez dos aleloquímicos encontrados pode ser um dos fatores responsáveis pela elevada capacidade exibida por essas plantas em colonizar ambientes degradados e com alta atividade antrópica.

Um aspecto importante na pesquisa em alelopatia é a identificação de compostos aleloquímicos envolvidos nas interações planta-planta e seus possíveis mecanismos de ação. Estes compostos incluem alcalóides, antocianinas, catequinas, chalconas, cumarinas, esteróides, fenóis, flavonas, flavonóis, flavononas, quinonas, resinas, saponinas, taninos, terpenóides e xantonas (LOTINA-HENNSEN et al., 1998; COSTA et al., 1999).

A *Cynara scolymus* (alcachofra), cultivada no Brasil, apresentou em sua composição química os flavonóides cinarosídeo e escolimosídeo, que são os maiores constituintes juntamente com a cinaropicrina, uma lactona sesquiterpênica com propriedades antitumorais, antimicrobianas e antifúngicas. Também foi encontrado o triterpeno lupeol (com ações antitumorais, antioxidantes e liberadores de mediadores da resposta imunológica) e em pequena concentração, a cinarina. Os flavonóides, que foram extraídos das frações acetato de etila e butanol, apresentaram várias ações farmacológicas, tais como atividades antibacterianas, antiinflamatória, antioxidante e outras (NOLDIN et al., 2003).

Os produtos secundários se encontram com

maior frequência e em maior número nas plantas. Estas substâncias aleloquímicas estão distribuídas, por todos os seus órgãos, a concentrações muito baixas e variáveis com as condições fisiológicas. Conhece-se cerca de 10.000 metabólitos diferentes (ALMEIDA, 1988).

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. As rotas biossintéticas dos metabólitos secundários talvez sejam ativadas durante alguns estágios de crescimento e desenvolvimento da planta ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataques microbiológicos. Embora qualquer tecido ou célula da planta tenha a capacidade de produzi-los, parece que isto acontece apenas em tecidos ou células especiais, tornando a biossíntese restrita a uma parte da planta, mas o armazenamento se dá em toda ela. Este armazenamento é de fundamental importância para a sobrevivência do vegetal.

Os objetivos deste trabalho foram: 1. comprovar em placas de Petri a atividade alelopática inibitória do extrato metanólico de caule e raiz de pequi, e os extratos obtidos após o seu fracionamento cromatográfico, sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de raiz e parte aérea (caule) da planta daninha *Panicum maximum*; 2. identificar os metabólitos secundários presentes no extrato de maior poder inibitório, obtido após o fracionamento do extrato bruto.

MATERIAL E MÉTODOS

Os solventes químicos usados foram de grau analítico e adquiridos da firma Vetec – Química Fina Ltda. Todas as medidas foram feitas em triplicata. As raízes e caules foram coletados num pequizeiro em campo aberto, nos arredores da cidade de Uberlândia-MG. Após secagem, foram cortados em pequenas lascas, com o auxílio de uma serra. Coletaram-se 5,0 kg de raiz da planta previamente identificada como *Caryocar brasiliense* (pequi). Com este material, realizou-se um processo de lavagem e uma posterior secagem em estufa a 45°C, até atingir peso constante.

Para a obtenção do extrato, este material foi misturado com 6 litros de metanol, onde o qual permaneceu por aproximadamente duas semanas, sendo agitado de 12 em 12 horas. Após este período, o sistema passou por processo de filtração em um funil de placa porosa e os filtrados obtidos foram concentrados por destilação a pressão reduzida com auxílio de um rotaevaporador, à temperatura de 40°C e secado à temperatura ambiente. O processo

descrito acima foi realizado com o caule de pequi, nas mesmas proporções descritas.

Ensaio em placas de Petri

Os ensaios de germinação foram realizados no LASEM (Laboratório de Análise de Sementes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia). Cada placa Gembox com a dimensão de 11x11 cm foi esterilizada com uma solução de hipoclorito de sódio e formol a 30%, lavada com água. Em seguida, 15 mL de cada solução e 25 sementes de *Panicum maximum* foram colocados em cada placa a qual foi colocada no germinador a uma temperatura entre 20 e 30 °C, com uma variação de ± 1 °C, de acordo com as recomendações da RAS (BRASIL, 1992), e fotoperíodo de 12 horas, por oito dias. Após este período, foi feita a contagem das sementes e medido o tamanho da raiz e caule. Este processo foi realizado com ambos os extratos de caule e raiz de pequi, todos realizados em triplicata.

Fracionamento do extrato bruto

Foi incorporado em sílica-gel 60 (70-230 mesh ASTM, para cromatografia em coluna) 140 g do extrato bruto do caule de pequi em uma proporção de 3:1 g sílica-gel: g de extrato, o qual foi filtrado em uma coluna de 10,0 cm de diâmetro e 1,20 m de comprimento, preenchida com 700,0 g de sílica-gel pura (aproximadamente 2/3 do tubo) para cromatografia. Foi passada a seguinte seqüência de solventes para a filtração:

- n- hexano
- diclorometano
- Acetato de Etila
- Acetato de Etila: Metanol (7:3)
- Acetato de Etila: Metanol (1:1)
- Metanol

As mudanças de solventes foram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência ocular 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.

O mesmo procedimento foi realizado com 160,00 g do extrato bruto de raiz.

Fracionamento das frações

Foi incorporado 13,00 g da fração acetato/metanol (7:3, v/v), em 39,00 g de sílica-gel. Foi colocada em uma coluna de vidro com 3,5 cm de diâmetro e 1,00 m de comprimento 172,00 g de

sílica-gel pura, juntamente com o solvente acetato/metanol (9:1, v/v) (porque foi o primeiro solvente a ser passado na coluna), de modo que esta sílica ficou em suspensão. Aguardou-se cerca de 3 horas, afim de que a sílica ficasse totalmente assentada, para evitar que alguma parte da coluna ficasse seca. Depois que terminou o assentamento da sílica, colocou-se mais solvente, resultando em 15,0 cm acima do nível da sílica em suspensão. Acrescentou-se, aos poucos, o extrato incorporado na sílica, seco, diretamente na coluna, observando a umidificação desta, evitando o empacotamento. Em ordem crescente de polaridade (mesmo critério utilizado na coluna seca), utilizou-se como solventes as seguintes misturas: acetato/metanol (9:1, v/v), acetato/metanol (8:2, v/v), acetato/metanol (7:3, v/v), acetato/metanol (4:6, v/v) e acetato/metanol (2:8, v/v). Estas subfrações foram colhidas de 500 em 500 mL, sendo concentrado por destilação a pressão reduzida com auxílio de um rotaevaporador, obtendo assim as subfrações da raiz.

A troca de solvente foi feita quando o solvente que estava sendo utilizado ficava incolor. Acrescentava-se o solvente seguinte, sem deixar a coluna secar. Deste modo, a fração seria obtida na transição dos solventes.

Tratamento dos dados

Completado o período de germinação, contou-se o número de sementes germinadas. Mediu-se, planta a planta, a parte aérea e a raiz. Fez-se uma média aritmética com os dados obtidos para a germinação, parte aérea e raiz, obtendo um valor representativo destes parâmetros analisados.

Identificação qualitativa de metabólitos secundários

Usando diferentes reativos, foram identificados os grupos funcionais (vide apêndice). Os reativos utilizados neste processo encontram-se a seguir:

• **Alcalóides:** Reativos Dragendorff, Mayer e Wagner. Uma leve turbidez ou precipitado (roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidencia a possível presença dos mesmos.

• **Cardiotônicos:** são realizados 6 ensaios para esta classe.

- Reativo de Baljet. Coloração roxa, laranja-roxeada ou violeta indica cardiotônicos.

- Reativo de Kedde. Uma coloração rosa ou azul-violeta ao visível indicam cardenólidos. A cor se atenua em poucos minutos.

- Reativo de Raymond-Marthoud, que indica a presença dos anéis lactônicos dos cardenólidos. As colorações encontradas são iguais às do Reativo de

Baljet.

- Reação de Keller-Kiliani. Apresenta colorações intensas.

- Reação de Liebermann-Burchard. As colorações encontradas podem verde, azul esverdeado ou roxo a azul.

- Reação de Salkowski. Coloração que varia de amarelo a roxo sangue indica núcleo esteroidal.

• **Cumarinas voláteis:** A fluorescência amarela sob luz UV indica a presença de cumarinas.

• **Flavonóides:** Mudança de coloração do Mg nas paredes do tubo na presença de HCl. Varia para as diferentes estruturas.

• **Taninos:** Reação com solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

• **Saponinas:** Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

• **Triterpenos e/ou esteróides:** Reação de Liebermann-Burchard e Salkowski. Colorações escuras indicam a presença destes compostos.

• **Derivados antracênicos livres:** Reação de Börntraeger. Coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas. Reação com solução de acetato de magnésio a 5 % em metanol. Coloração roxa indica a presença de antraquinonas livres.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtida uma massa de extrato de 153,55g do caule e 181,90 da raiz, o que corresponde a 3,07 e 3,64%, respectivamente.

Os resultados da Figura 1 mostram que o extrato do caule de pequi apresentou inibição sobre o *P. maximum*. A concentração de 100 ppm não afetou o crescimento da parte aérea. As concentrações de 50 e 100 ppm não apresentaram nenhuma inibição considerável, pois todas as médias destas duas concentrações ficaram abaixo da casa dos 50%. As inibições foram acentuadas nas concentrações de 150 e 200 ppm. Este teste mostrou que o extrato do caule de pequi possui propriedades alelopáticas. Seu melhor efeito de inibição ocorreu na concentração de 200 ppm, tanto na germinação quanto na elongação da raiz e parte aérea. Assim, novos testes foram realizados com este extrato com a concentração de 200 ppm.

Segundo Rice (1984), estímulos e inibições no desenvolvimento das plantas na presença de extratos de outras plantas são comumente encontrados quando se trabalha com substâncias alelopáticas. Este fato se deve à concentração na qual estas substâncias se encontram, pois estas podem estimular ou inibir o crescimento das plantas em concentrações apropriadas. Este fato pode ser observado quando o extrato do caule não afetou o crescimento da parte aérea em 100 ppm e inibiu em torno de 80% em 200 ppm.

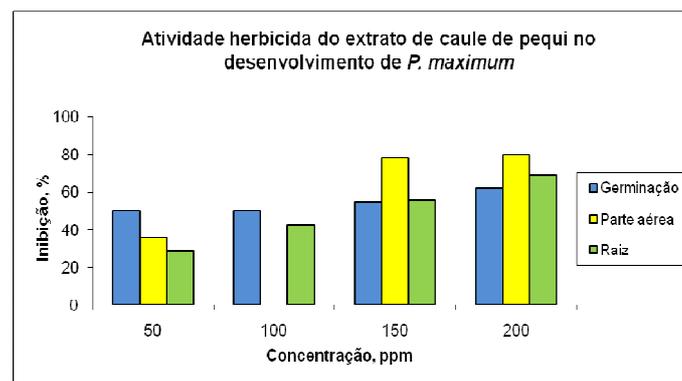


Figura 1. Efeitos da concentração do extrato metanólico de caule de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Os efeitos da concentração do extrato metanólico da raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum* são apresentados na Figura 2. Observa-se que a germinação foi pouco influenciada pelos extratos nas concentrações de 150 ppm e a 200 ppm voltou a ser inibida, sendo que a variação foi de apenas 3%.

Pode-se notar também que a elongação da raiz e parte aérea foram afetadas, e que quanto maior foi a concentração do extrato na solução, maior foi a inibição observada. Com este teste, pode-se determinar que o extrato da raiz do pequi também possui poder alelopático e que a concentração mais indicada será de 200 ppm.

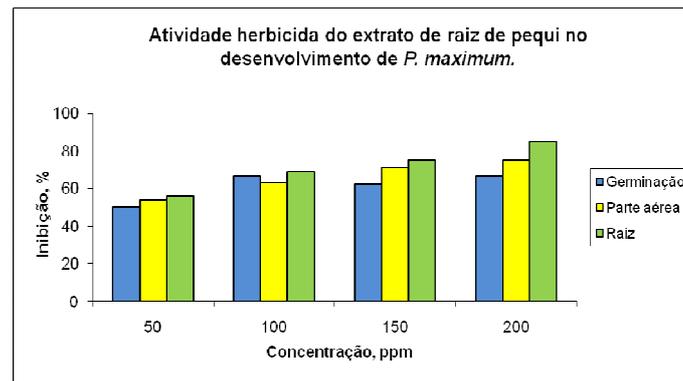


Figura 2. Efeitos da concentração do extrato metanólico da raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Chou e Waller (1980) realizaram trabalho semelhante com extrato aquoso das folhas, caule e raiz de *Coffea arabica*, sobre a germinação e crescimento radicular de centeio e alface.

Verificaram que os extratos inibiram significativamente tanto a germinação das sementes e o crescimento radicular. Parvez et al. (2003) estudaram o potencial alelopático do extrato metanólico das folhas de tamarindo e encontraram boas inibições, principalmente com as espécies daninhas grama de celeiro e o trevo branco.

Quando se compara o efeito alelopático entre os dois extratos em estudo, percebe-se que os efeitos inibitórios da raiz de pequi foram mais pronunciados do que os efeitos do caule. É importante mencionar que os aleloquímicos produzidos por uma planta são encontrados por toda parte da mesma, mas as concentrações mais elevadas se encontram nas folhas frutos e raízes

(KUNZE et al., 1996). Então este fato é devido à maior quantidade de substâncias inibitórias encontradas no extrato de raiz do que as encontradas no caule, pois a raiz se encontra no solo e é uma das principais entradas de nutrientes e água na planta, estando também mais suscetível ao ataque de microorganismos e aleloquímicos de outras plantas vizinhas que estão se defendendo ou até mesmo atacando, em busca de melhores condições para seu desenvolvimento. Já o caule se encontra elevado em relação ao solo, está coberto pela casca e, portanto, sujeito à bem menos ameaças do que a raiz. Por isso, o poder alelopático do caule é menor do que o da raiz.

Na seqüência, fracionaram-se os extratos metanólicos brutos, com solventes em escala crescente de polaridade. A Tabela 1 mostra os resultados deste fracionamento para o extrato de caule.

Tabela 1: Massas e percentagens das frações do extrato de caule de pequi.

Solvente	Massa fração	%
diclorometano	0,71	0,51
acetato de etila	2,40	1,71
7-acetato: 3-metanol	12,86	9,19
1-acetato: 1-metanol	21,96	15,69
metanol	95,35	68,11
Total	133,28	95,21

Através da coluna cromatográfica seca, eluiu-se seis solventes já citados anteriormente (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetato/metanol (7:3), acetato/metanol (1:1), metanol). A fração hexânica foi examinada com luz UV, o que constatou que nenhum composto sensível ao UV foi arrastado por este solvente. Nenhum outro teste foi realizado, podendo ter gerado perda de compostos. Já com os demais solventes, à medida que a polaridade aumentou, a percentagem de massa obtida na fração também aumentou, indicando uma quantidade maior de compostos polares presentes no

extrato do caule.

O rendimento total das frações foi de 95,20%. Esta perda pode estar associada aos procedimentos experimentais realizados e ao material que ficou retido na coluna.

Uma solução de 200 ppm de cada fração do extrato de caule de pequi foi preparada, além de uma solução branco para a realização da germinação. O resultado do teste de germinação das frações do caule de pequi está apresentado na Figura 3.

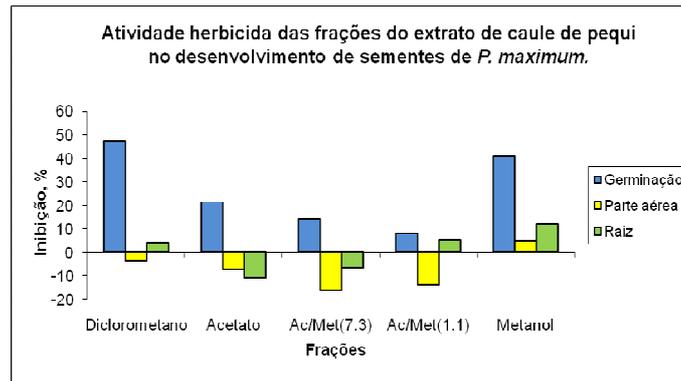


Figura 3: Efeitos das frações do extrato de caule de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Analisando a Figura 3, nota-se que o efeito de algumas das frações do extrato de caule de pequi foi benéfico e não inibitório, ou seja, estimularam o crescimento da parte aérea nas frações de diclorometano (DCM), acetato de etila, acetato/metanol (1:1) e acetato/metanol (7:3), o que segundo Rice (1984) é perfeitamente normal de ser encontrado. O crescimento da raiz também foi estimulado pelas frações de acetato de etila e acetato/metanol (7:3). As frações de diclorometano e metanol apresentaram inibição de 47,17 e 40,75%, respectivamente. Apesar de ser uma inibição relativamente alta, não pode ser considerada para futuras análises, pois só é considerada quando a % de inibição ultrapassa os 50%.

Quando se compara o resultado dos efeitos entre o extrato metanólico bruto do caule e os das frações deste, observa-se uma contradição: o extrato bruto apresentou maior eficácia do que suas frações. Quando se fez a separação na coluna cromatográfica, esperava-se que as frações apresentassem melhores inibições do que o extrato bruto, pois separou os compostos entre as frações, tornando-os pouco mais puros. Assim, quando se utiliza a concentração que apresentou o melhor resultado com o extrato bruto, a concentração do princípio ativo nas frações estaria maior do que

aquele presente anteriormente, o que causaria resultados melhores do que os observados com o extrato bruto. Portanto, pode-se afirmar que ocorreu o fenômeno de sinergismo, ou seja, dois ou mais compostos agem em conjunto para provocar um efeito alelopático, e quando separou as frações, provavelmente diminuiu o sinergismo dos compostos responsáveis pela inibição observada com o extrato bruto do caule. Desta forma, os compostos isolados apresentam certo potencial herbicida quando agem isoladamente, mas esta propriedade herbicida é potencializada através da sinergia com outros compostos presentes. Colby (1967 *apud* Rice, 1984) testou o efeito de várias combinações de compostos alelopáticos e observou que valores menores que do que os dos extratos brutos indicaram sinergismo, e os valores maiores do que os esperados sugeriam antagonismo. Realizou-se o mesmo processo de separação em cromatografia de coluna com o extrato de raiz. Os resultados obtidos no procedimento de cromatografia em coluna estão dispostos na Tabela 2.

Com as frações obtidas, foram realizados novos testes de germinação. Os resultados destes testes estão apresentados na Figura 4.

Tabela 2: Massas e porcentagens das frações do extrato de raiz de pequi.

Solvente	Massa da fração	%
hexano	0,46	0,29
diclorometano	0,75	0,47
acetato de etila	3,04	1,90
7-acetato: 3-metanol	13,98	8,74
1-acetato: 1-metanol	25,49	15,93
metanol	107,57	67,23
Total	151,29	94,56

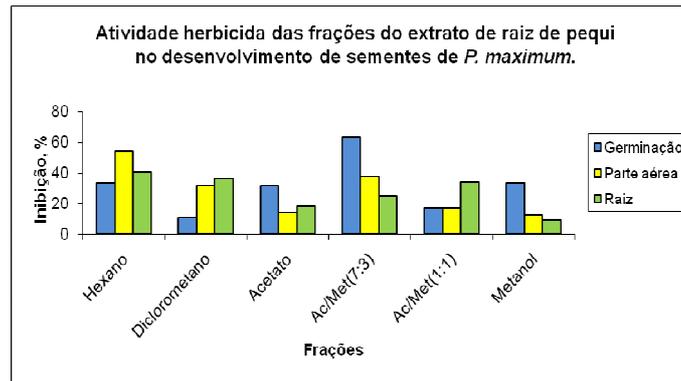


Figura 4: Efeitos das frações do extrato de raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Observando-se a Figura 4, notam-se os resultados encontrados não foram tão bons quanto os encontrados com o extrato metanólico bruto de raiz. Novamente, pode-se afirmar que ocorreu o fenômeno de sinergia. As inibições observadas nestas frações estão relacionadas com a ação isolada de algum composto presente nas mesmas que possuem propriedades herbicidas ou da sinergia dos compostos desta fração. Pode-se perceber que as frações do extrato de raiz não beneficiaram nenhum dos parâmetros estudados.

A fração acetato/metanol (7:3) e a fração de hexano, respectivamente, apresentaram atividades herbicidas mais pronunciadas, onde a fração acetato/metanol (7:3) apresentou uma inibição de 62,94% sobre a germinação, enquanto a fração hexano inibiu a elongação da parte aérea da planta daninha em 54,36%. Os demais parâmetros destas duas frações não sofreram nenhum dano maior que 50%, o que indica que uma sinergia foi responsável pela inibição observada com o extrato bruto.

Quando se compara a ação das frações de

hexano e acetato/metanol (7:3) com o extrato bruto da raiz, verifica-se que a % de inibição diminuiu, passando de 85,00 para 54,36% na elongação da parte aérea e de 77,00 para 62,94% na germinação. Isto mostra que houve o fenômeno da sinergia com o extrato bruto de raiz de pequi, pois estando os compostos pouco mais purificados do que estavam quando presentes no extrato bruto, a inibição diminuiu, quando era esperado o contrário, ou seja, o aumento da inibição.

Um subfracionamento foi realizado com a fração acetato/metanol (7:3), uma vez que esta fração apresentou melhor inibição no índice de germinação. Os solventes foram passados pela coluna na ordem apresentada pela Tabela 3. Durante o processo de separação na coluna, as subfrações foram colhidas em intervalo de 500 em 500 mL. Foram colhidas, ao todo, 23 subfrações, sendo que aquelas que apresentaram características semelhantes (testadas em cromatografia de placas) foram juntadas, obtendo, deste modo, 13 subfrações (Tabela 3).

Tabela 3: Subfrações da fração 7:3 acetato de etila/ metanol.

Subfração	Solvente (ac/MeOH)	Massa subfração (g)	%
1	9:1	2,12	16,30
2	9:1	4,48	34,44
3	9:1	1,53	11,74
4	9:1	0,86	6,64
5	9:1	0,94	7,22
6	8:2	0,59	4,53
7	8:2	0,46	3,53
8	7:3	0,2	1,52
9	7:3	0,13	0,97
10	7:3	0,07	0,55
11	7:3	0,08	0,58
12	4:6	0,17	1,33
13	2:8	0,09	0,67
Total	--	11,72	90,02

Pode-se observar que houve perdas nos fracionamentos realizados, em torno de 5 a 10%. Estas perdas podem estar associadas ao procedimento experimental.

Um teste de germinação foi feito com as subfrações, obedecendo aos requisitos já determinados (uma solução de branco e as soluções das subfrações com concentração de 200 ppm). O resultado obtido apresentou a germinação apenas do branco (o controle do teste Para confirmação). Outro teste foi realizado, sob as mesmas condições do anterior. Novamente foi observado que apenas o branco desenvolveu, apresentando uma média de germinação de 18 sementes, com uma elongação média da raiz e do caule de 26,67 e 33,20 mm, respectivamente. Duas hipóteses foram levantadas: ou todas as subfrações apresentaram altas inibições ou a concentração utilizada foi alta, de modo que não permitiu o desenvolvimento normal das

sementes.

Um terceiro teste foi feito, onde a concentração das soluções foi mudada de 200 para 100 ppm, mantendo os demais requisitos. Com estas novas condições, foi possível obter um resultado satisfatório, o qual está sendo mostrado na Figura 5.

Pela Figura 5 pode-se observar que as 13 subfrações apresentam atividades herbicidas bem diferenciadas. Assim, determinou-se que a concentração foi a causa da perda dos dois testes de germinação realizados com a concentração de 200 ppm, uma vez que a concentração foi diminuída, o teste mostrou boas condições para análises. O fator de inibição não foi o responsável pelo o não desenvolvimento normal das sementes nos testes, pois nenhuma das subfrações apresentou um índice de inibição alto, com o qual podia inibir totalmente as sementes nos testes de germinação.

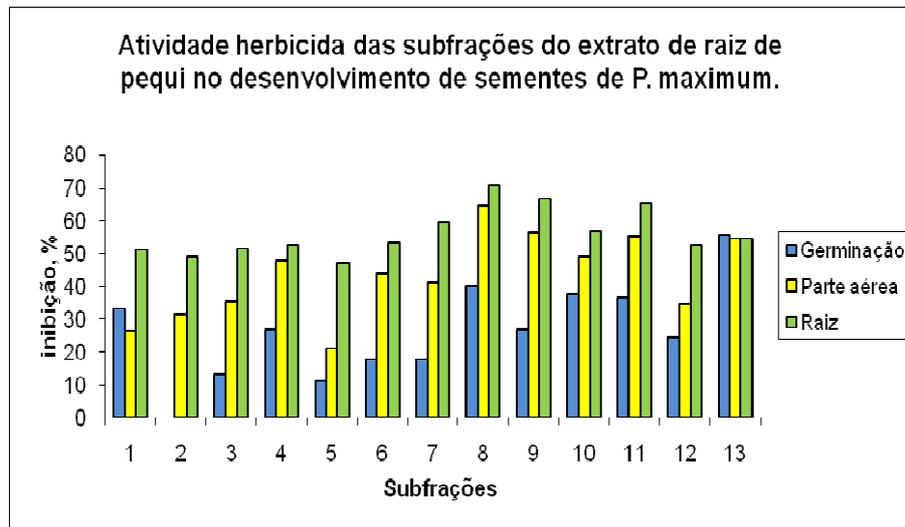


Figura 5: Efeitos das subfrações do extrato de raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Pode-se notar também que as subfrações apresentaram efeitos de sinergia, pois mesmo os compostos presentes estando em concentrações mais altas do que os compostos da fração acetato/metanol (7:3), os resultados foram menos expressivos: a inibição provocada pelas subfrações foi menor do que a encontrada com a fração acetato/metanol (7:3) do extrato de caule de pequi. Os melhores resultados foram apresentados pela subfrações 8, 11 e 13, porque foram estas subfrações que conseguiram inibir melhor os três parâmetros estudados nos ensaios de germinação. A fração de hexano também apresentou boas inibições nos três parâmetros

analisados. Deste modo, as análises futuras deverão ser realizadas com a fração hexânica e três subfrações obtidas da fração acetato/metanol (7:3), devido aos potenciais herbicidas que apresentaram foram os melhores, mesmo sabendo que o ponto máximo da atividade herbicida ocorreu devido ao fenômeno de sinergismo.

Na seqüência, foram realizados testes de reconhecimento das classes de metabólitos secundários presentes na fração e subfrações selecionadas. Os resultados destes ensaios estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos testes de reconhecimento das classes de metabólitos secundários nas frações e subfrações ativas.

Teste de reconhecimento	Fração de hexano	de Subfração 8	Subfração 11	Subfração 13
Alcalóides	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Cardiotônicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cumarinas voláteis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Flavonóides	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Taninos	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (condensável)
Saponinas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Triterpenos e/ou Esteróides	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Derivados Antracênicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Livres				

As cumarinas são listadas como inibidores muito potentes de germinação de sementes (EVENARI, 1949, *apud* RICE, 1984). Van Sumere et al. (1971 *apud* Rice, 1984) reportaram que as ações das cumarinas estão relacionadas com o aproveitamento do oxigênio pelas sementes. Um outro estudo mostrou que uma solução saturada de cumarina bloqueia toda a mitose em cebolas e raízes de lírios dentro de 2 a 3 horas de aplicação, impedindo a entrada de células neste processo (CORNMANN, 1946, *apud* Rice, 1984).

Stenlid (1970 *apud* Rice, 1984) pesquisou um grande número de flavonóides e seus efeitos na produção de ATP por mitocôndrias isoladas de várias plantas e verificou que estes aleloquímicos são capazes de inibir a produção de ATP. Rice (1984) verificou que flavonóides agem especificamente no mecanismo de fosforização e não na transferência de elétrons. Apesar do grande número de distribuição universal dos flavonóides, poucos são envolvidos em fenômenos de alelopatia, devido à dificuldade de serem identificados.

Há poucos relatos do envolvimento de taninos condensados na alelopatia do que os hidrolisáveis. Basaraba (1964 *apud* Rice, 1984) verificou que taninos inibiam a nutrificação dos solos, e Rice e Pancholy (1973 *apud* Rice, 1984) encontraram que taninos condensáveis são possivelmente importantes inibidores das bactérias responsáveis pela nutrificação de espécies de grama alta. Os taninos estão envolvidos na inibição do hormônio de crescimento, onde inibem o crescimento induzido por giberelina, particularmente na atividade de GA₄ e GA₁₄ (CORCORAN et al., 1972, *apud* Rice, 1984).

Os alcalóides são bem conhecidos devido aos seus efeitos fisiológicos em humanos e seu uso na farmácia. Estes compostos também são muito importantes devido à suas atividades inibidoras de

germinação de sementes. Também foram encontrados em sementes, por serem tóxicos para muitos microorganismos (EVENARI, 1949, *apud* Rice, 1984).

A regra natural das saponinas é comumente estar na defesa contra ataques de patógenos e pestes (HARALAMPIDIS et al., 2001). Saponinas encontradas na raiz e folhas da alfafa cultivada no Usbequistão apresentaram ações inibidoras da porcentagem de germinação de repolho, quando comparadas com o controle. Também são conhecidos por sua influência em organismos animais, afetando o crescimento de fungos e insetos (TIMBEKOVA; ISAEV; ABUBAKIROV, 1996).

Estes metabólitos secundários cumprem papel importante na atividade herbicida e, juntamente com outros compostos, tem seu potencial de inibição potencializado.

CONCLUSÕES

Os extratos de caule e raiz de pequi apresentaram o fenômeno de alelopatia sobre o desenvolvimento do *P. maximum* na concentração de 200 ppm.

Foram identificadas as presenças de alcalóides, cumarinas voláteis, flavonóides, taninos condensáveis na fração hexânica e subfrações 8, 11 e 13. Também foi identificada a presença de saponinas em todas elas.

A atividade herbicida dos extratos está associada a um comportamento sinérgico, pois a os potenciais herbicidas reduzem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Química pelo suporte de infra-estrutura e a CAPES, a FAPEMIG e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

ABSTRACT: The methanolic stem and root's extracts were tested in order to certificate their herbicide potential in germination test, which analyzed germination rate, stem and root's length of *Panicum maximum* weeds. It was observed that the both extracts, of stem and root. The both extract presented herbicide potentials and the root's extract were better than stem's extract. The hexanic fraction and the subfractions 8, 11 e 13 (extracted from acetate/methanol 7:3) also presented inhibition. The recognition of secondary metabolites' tests showed the presence of alkaloids, volatile coumarins, flavonoids and condensed tannins in the hexanic fraction and 8, 11 e 13 subfractions, respectively. In all of them, it was found saponins too. The herbicide activity of root and stem extracts, their fractions and subfractions were associated of synergy phenomenon among the compounds were there.

KEYWORDS: Pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*). Allelopathic activity. Allelopathic herbicides.

REFERÊNCIAS

- ALIOTTA, G.; CAFIERO, G.; DE FEO, V.; SACCHI, R. Potential Allelochemicals from *Ruta graveolens* L. and their action on Radish seeds. **Journal of Chemical Ecology**, Heildenberg, v. 20, n. 11, 2761-2775, Nov. 1994.
- ALMEIDA, F. S. **A Alelopatia e as Plantas**. Londrina, PR: IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná). 60p, ilustrado. (IAPAR. Circular, 53), 1988. 464 p.
- BAGHESTANI, A.; LEMIEUX, C.; LEROUX, G.; BAZIRAMAKENGA, R. Determination of Allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. **Weed Science**, Ann Arbor, v. 47, n. 5, p. 498-507. Sept.- Oct. 1999.
- BISOGNIN, D. A.; AMARANTE, C. V. T.; DELLAI, J. Contribuição das folhas cotiledonares para o crescimento e estabelecimento de plântulas de cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 309-313, abril-junho 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CHOU, C. H.; WALLER, G. R. Possible Allelopathic Constituents Of *Coffea arabica*. **Journal of Chemical Ecology**, Heildenberg, v. 6, n. 3, p. 643-654, May 1980.
- COLEGATE, S.; MOLYNEUX, R. **Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination**. London, 1993. 528p.
- COSTA, A. V.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A. Synthesis and Herbicidal Activity of 2 α , 4 α -Dimethyl-8-oxabicyclo[3.2.1] oct-6-en-3-one Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 11, p. 4807-48114. Nov. 1999.
- DUKE, S. O.; SMEDA, R. J.; WESTON, L. A. Potential for utilization of allelopathy for weed management. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997. Caxambu. **Anais...** 1997. p. 111-116.
- HARALAMPIDIS, K.; BRYAN, G.; QI, X.; PAPADOPOULOU, K.; BAKHT, S.; MELTON, R.; OSBOURN, A. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 23, p. 13431-13436, Nov. 2001.
- IKAN, R. **Natural products**. A laboratory guide. New York: Academic press, 360p. 1991.

KUNZE, A.; AREGULLIN, M.; RODRÍGUEZ, E.; PROKSCH, P. Fate of chromene encocalin in the interaction of *Encelia farinosa* and its specialized herbivore *Trirhabda geminata*. **Journal Chemical of Ecology**, Heildenberg, v. 22, p. 491-498, Mar. 1996.

LOTINA-HENNSSEN, B.; MATA, R.; CALDERON, J.; CESPEDES, C.; JIMENEZ, M. Secondary metabolites isolated from Mexican plants: Target and mechanism of action on photosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 2, p. 165, feb. 1998.

MIZUTANI, J. Selected Allelochemicals. **Critical Reviews in Plants Sciences**, Oxford, v. 18 n. 5 p. 653-671. Sept.- Oct. 1999.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição Química e Atividades Biológicas das Folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) Cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334. Maio – jun. 2003.

PARVEZ, S. S.; PARVEZ, M. M.; NISHIHARA, E.; GEMMA, H.; FUJII, Y. *Tamarindus indica* L. leaf is a source of allelopathic substance. **Journal of Plant growth regulation**, Heildenberg, v. 40, n. 2, p. 107-115, June 2003.

REIGOSA, M.; PEDRO, L. N. **Allelopathy from molecules to ecosystems**. NH, USA, Science Publishers Inc. 316p. 2002.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological Approach in Allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 577-608, Sep. - Oct. 1999.

RICE, E. L. **Allelopathy**. Orlando, 2ª edição, Academic Press Inc, 422 p., 1984.

SOARES, G. L. G.; VIEIRA, T. R. Inibição da Germinação e do Crescimento radicular de Alface (cv. “Grand Rapids”) por Extratos Aquosos de Cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 7, n. 1, p. 180-197, abr. 2000.

TIMBEKOVA, A. E.; ISAEV, M. I.; ABUBAKIROV, N. K. Chemistry and Biological Activity of triterpenoid glycosides from *Medicago sativa*. In **Advances in Experimental Medicine and Biology - Saponins used in food and agriculture**. v. 405, Waller GR, Yamasaki K (Eds). Plenum Press, New York. p. 171-182, 1996. Review

APÊNDICE

1-Reativos de coloração e precipitação usados em testes de reconhecimento

- **Reativo de Mayer:** solução de iodeto de mercúrio e de potássio.
Misture 1,36 g HgCl₂ / 60mL de água e 5 g de KI / 10mL de água. Misturar e diluir a 100mL.
- **Reativo de Wagner:** solução de iodo em iodeto de potássio.
Dissolver 1,27g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 5 mL de água. Levar a solução a 100mL com água.
- **Reativo de Dragendorff:**
Solução A: dissolver 1,7g de nitrato de bismuto(III) e 20g de ácido tartárico em 80 mL de água.
Solução B: dissolver 16g de iodeto de potássio em 40 mL de água.
Solução Estoque: misturar partes iguais de A e B. Se se resfria a solução estoque, ela é estável por vários meses.
Solução Spray: dissolver 10g de ácido tartárico em 50 mL de água, juntar mL de solução estoque.
- **Reativo de Baljet:** 1A + 1B
A- 1g de ácido pícrico / 100mL de EtOH

B- 10g de NaOH / 100mL de água

- **Reativo de Kedde:** misturar volumes iguais de A e B

A- Ácido 3,5- dinitrobenzóico a 3% em metanol

B- KOH a 5,7% em água.

- **Reativo de Raymond-Marthoud:** Dissolva 1g de m-dinitrobenzeno em etanol, completando o volume de 100mL.

- **Reativo de Liebermann-Burchard:** 5mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado se juntam cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, enquanto se resfria em banho de gelo. O reativo estar recém-preparado. Para reação em tubo, coloca-se 10mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

- **Reativo de Salkowski:** ácido sulfúrico concentrado.

- **Reativo citrobórico:** dissolva 5g de ácido bórico e 5g de ácido cítrico em etanol e complete o volume da solução em 100mL.

- **Solução de cloreto férrico:** solução a 10% de cloreto férrico em água destilada.

- **Reativo de gelatina:** solução a 1% de gelatina Merck em água destilada.

- **Reativa gelatina-sal:** 1g de gelatina, 10g de cloreto de sódio e água destilada completando o volume da solução em 100mL.

- **Solução salina:** a 10% de cloreto de sódio em água destilada.

- **Reativo de Boroträger:** solução de NaOH a 5% em água.

2- Desenvolvimentos da Identificação De Metabolitos Secundários

O desenvolvimento da identificação destes grupos encontra-se a seguir:

- **Alcalóides:** secou-se 30 mL do extrato metanólico da raiz, adicionou-se 5 mL de HCl (10%) e esquentou-se por 10 minutos. Esfriou-se, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em 3 tubos de ensaios e colocaram-se 5 gotas dos reativos Dragendorff, Mayer e Wagner. Leve turbidez ou precipitado (roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidencia a possível presença dos mesmos.

- **Cardiotônicos:** a 10 mL de extrato metanólico da raiz, adicionou-se 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e 4 mL de água destilada. Esquentou-se a mistura a banho-maria durante 10 minutos. Filtrou-se. Agitou-se o filtrado com 20 mL de clorofórmio, separou-se a capa clorofórmica em 6 tubos de ensaio, levando à secura. Adicionou-se:

- Tubo 1, acrescente 1 mL de Reativo de Baljet. Coloração roxa, laranja-roxeada ou violeta indica a presença de cardiotônicos.

- Tubo 2, acrescente 1 mL de Reativo de Kedde. Uma coloração rosa ou azul-violeta ao visível indicam cardenólidos. A cor se atenua em poucos minutos.

- Tubo 3, acrescente 1 mL de Reativo de Raymond-Marthoud, que indica a presença dos anéis lactônicos dos cardenólidos. As colorações encontradas são iguais às do Reativo de Baljet.

- Tubo 4, faça a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, uma gota de cloreto férrico a 5% em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Apresenta colorações intensas.

- Tubo 5, realize a reação de Liebermann-Burchard (1 mg da amostra/5 gotas de HOAc + 3 mL Ac₂O/H₂SO₄ (50:1)). As colorações encontradas podem verde, azul esverdeado ou roxo a azul.

- Tubo 6, faça a reação de Salkowski. Uma coloração que varia de amarelo a roxo sangue indica presença de núcleo esteroidal.

- **Cumarinas voláteis:** em 1 tubo de ensaio colocou-se 2 mL de extrato metanólico da raiz, tampou-se com papel de filtro impregnado em NaOH a 5% e levou-se a banho de água a 100° C por 10 minutos. Removeu-se o papel e examinou-se sob luz UV. A fluorescência amarela indica a presença de cumarinas.

- **Flavonóides:** colocou-se em um tubo, 2 mL do extrato metanólico da raiz e agregou-se fragmentos de Mg pelas paredes do tubo e algumas gotas de HCl diluído. Observou-se a coloração, que varia para as diferentes estruturas.

- **Taninos:** evaporou-se 5 mL do extrato metanólico e dissolveu-se o resíduo em 10 mL de água destilada. Filtrou-se. A 3 mL do extrato aquoso, adicionou-se 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

- **Saponinas:** evaporou-se 5 mL do extrato metanólico e colocou-se água fervendo. Esfriou-se, agitou vigorosamente e deixou em repouso de 15 a 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

- **Triterpenos e/ou esteróides:** levou-se à secura 10 mL do extrato metanólico da raiz, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, filtrou-se, dividiu-se em duas porções o filtrado. Em cada um dos tubos realizou-se e reação de Liebermann-Burchard e Salkowski.
- **Derivados antracênicos livres:** colocou-se em um tubo de ensaio 0,20 g da planta e adicionaram-se 5 mL de clorofórmio, agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo, colocou-se 1 mL de solução de NaOH a 5% em água. Coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas (Reação de Börntraeger). No segundo tubo, adicionou-se 1 mL de solução de acetato de magnésio a 5 % em metanol. Coloração roxa indica a presença de antraquinonas livres.