



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA
DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DE FOLHAS DE *Curatella*
americana L. (LIXEIRA).



ORIENTADOR: Prof. Dr. MANUEL G. HERNANDEZ TERRONES
ALUNA: CECÍLIA SOARES BARBOSA

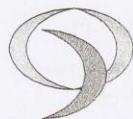
UBERLÂNDIA – MG

2011

CECÍLIA SOARES BARBOSA

**AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA E CARACTERIZAÇÃO
FITOQUÍMICA DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DE
FOLHAS DE *Curatella americana* L. (LIXEIRA).**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
para a obtenção do título de Mestre
em Química, sob orientação do Prof.
Dr. Manuel G. Hernandez Terrones,
no programa de Pós - Graduação em
Química.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – MESTRADO
E-mail: cpgquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): CECÍLIA SOARES BARBOSA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 97144

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

*“Avaliação alelopática e caracterização fitoquímica do
extrato em diclorometano de folhas de
Curatella americana L. (ixeira)”*

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. MANUEL GONZALO HERNÁNDEZ-TERRONES

A Dissertação foi APROVADA em apresentação pública realizada no Auditório A do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, no dia 2 de agosto de 2011, às 15h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

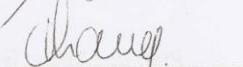
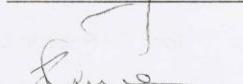
NOME:

Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones
(IQUFU)

Prof. Dr. Roberto Chang
(IQUFU)

Profª Dra. Rafaela Karin de Lima
(UFSJR)

ASSINATURA:

Uberlândia, 2 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e pelos ensinamentos diários.

Aos meus pais, Celso Mesquita Barbosa e Sani Mara Soares Barbosa por todo amor e confiança depositada em mim, e que sempre colaboraram para a minha formação moral, cultural e espiritual. Ao meu irmão William Soares Barbosa pelo carinho e companheirismo.

Ao meu namorado Clóvis Vítor de Oliveira pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao Prof. Dr. Manuel G. Hernandez Terrones pela sua orientação e dedicação.

Ao Prof. Dr. Antônio Eduardo Da Hora Machado por todo apoio para a realização deste trabalho.

Ao aluno de mestrado Júlio César Cardoso da Silva da Universidade Federal de Ouro Preto pela injeção da amostra no cromatógrafo a gás.

Aos Professores Dr. Roberto Chang e Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes pela colaboração na interpretação das análises de cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa.

Ao Dr. Douglas Queiroz Santos pela colaboração neste trabalho.

Ao técnico Adílio de Sá Júnior do Instituto de Ciências Agrárias da UFU pela disponibilidade e colaboração nos ensaios de germinação.

Aos técnicos Edmilson e Moacir Júnior e às colegas de laboratório do Instituto de Química - UFU, Fernanda Menezes Maia e Janainne Nunes Alves que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os amigos e familiares que compartilharam momentos de diversão e tristeza e que me ajudaram a alcançar mais uma etapa.

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 - INTRODUÇÃO.....	11
1.1 - ALELOPATIA.....	11
1.2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	12
1.3 – ALELOQUÍMICOS.....	14
1.4 – HERBICIDAS SINTÉTICOS X BIOHERBICIDAS.....	18
1.5 – DISTRIBUIÇÃO E OCORRÊNCIA DO <i>Panicum maximum</i> (Capim-colonião).....	19
1.6 – DISTRIBUIÇÃO E PROPRIEDADES DE <i>Curatella americana</i> L. (Lixeira).....	20
2 - OBJETIVOS.....	22
3 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	23
4 - METODOLOGIA.....	24
4.1 – COLETA DO MATERIAL.....	24
4.2 - OBTEÇÃO DO EXTRATO.....	24
4.3 - PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	24

4.3.1 – Ensaios de germinação em caixas gerbox e em casa de vegetação....	24
4.3.2 – Reagentes para identificação dos Metabólitos Secundários.....	25
4.4 - ENSAIOS DE GERMINAÇÃO EM CAIXAS GERBOX.....	25
4.5 - ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	25
4.6 - CLASSIFICAÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	25
4.7 - CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS POR CCD.....	29
4.8 – CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	32
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Rendimento do extrato.....	33
5.2 Germinação em caixas gerbox.....	33
5.3 Casa de Vegetação.....	36
5.4 Prospecção Fitoquímica.....	38
5.5 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	39
6 - CONCLUSÕES.....	41
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8 - APÊNDICE.....	47

ÍNDICE REMISSIVO PARA FIGURAS

Figura 1. Exemplos de estruturas de herbicidas comerciais.....	12
Figura 2: Estrutura química do ácido cítrico.....	14
Figura 3: Estrutura química da umbeliferona.....	14
Figura 4: Estrutura química do ácido esteárico.....	15
Figura 5: Estrutura química da tetraciclina.....	15
Figura 6: Estrutura química do ácido benzóico.....	15
Figura 7: Estrutura química do ácido cinâmico.....	15
Figura 8: Estrutura química da quecertina.....	16
Figura 9: Estrutura química do ácido gálico.....	16
Figura 10: Estrutura química do limoneno.....	16
Figura 11: Estrutura química da cafeína.....	17
Figura 12: <i>Curatella americana</i> L. (lixeira).....	21
Figura 13: Folhas de <i>Curatella americana</i>	21
Figura 14: Ramo florido de <i>Curatella americana</i> L.....	21
Figura 15. Ensaio de germinação das folhas de <i>Curatella americana</i> L.....	21
Figura 16. Efeitos da concentração do extrato em diclorometano das folhas de <i>Curatella americana</i> L. no desenvolvimento de sementes de <i>Panicum maximum</i> Jacq. em caixas gerbox.....	34
Figura 17: Efeitos da concentração do extrato metanólico de caule de <i>Cenchrus echinatus</i> no desenvolvimento de sementes de <i>Panicum maximum</i> Jacq.....	35
Figura 18: Ensaio de germinação do caule de <i>Origanum majorana</i> L.....	35
Figura 19: Foto do <i>Panicum maximum</i> Jacq. no ensaio pós-emergente realizado em casa de vegetação.....	36
Figura 20: Efeitos da concentração do extrato em diclorometano das folhas de <i>Curatella americana</i> L. no desenvolvimento de sementes de <i>Panicum maximum</i> Jacq. em casa de vegetação.....	37
Figura 21: Cromatograma obtido por CG/EM.....	39

ÍNDICE REMISSIVO PARA TABELAS

Tabela 1: Partes da planta <i>Curatella americana</i> L.....	21
Tabela 2: Testes de prospecção fitoquímica nas folhas de <i>Curatella americana</i> L.....	38
Tabela 3: Compostos identificados por CG/EM, com suas respectivas estruturas e fórmulas moleculares.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

CG/EM - Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas
UV - Ultravioleta
CCD - Cromatografia de Camada Delgada
AcOH - Ácido Acético
MeOH - Metanol
AcOEt - Acetato de Etila
CH ₂ Cl ₂ - Diclorometano
NH ₄ OH - Hidróxido de Amônio
AlCl ₃ - Cloreto de Alumínio
KOH - Hidróxido de Potássio

RESUMO

Os métodos atuais de controle das plantas daninhas têm provocado uma insatisfação de ordem social, por colocarem em risco a qualidade dos alimentos de uso humano e animal. Diante de tal problema, associado ao aparecimento de espécies mais resistentes aos atuais herbicidas, se faz necessário, a busca de novas alternativas de controle. O presente trabalho descreve uma avaliação fitotóxica do extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L. (lixeira) com o propósito de avaliar sua eficiência em relação à inibição na germinação, desenvolvimento das raízes e parte aérea de sementes de *Panicum maximum* (capim-colonião), em caixas Gerbox e em casa de vegetação, e a posterior caracterização dos compostos alelopáticos responsáveis pela inibição. Foram realizados testes de germinação, com fotoperíodo de 10 h por 7 dias e utilizando soluções dos extratos nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. O extrato apresentou um elevado potencial fitotóxico, em concentrações semelhantes às utilizadas pelos herbicidas comerciais. Na análise qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L. foram classificados flavonóides, agliconas antraquinônicas, triterpenos, esteróides, polifenóis e taninos. O mesmo foi analisado através da técnica de Cromatografia a Gás acoplada à espectrometria de Massas, no qual foram identificados seis picos principais, sendo eles: 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol; 2-Hexadeciloxirano; 1-(+)-ácido ascórbico2,6-dihexadecanoato; Etil-hexadecanoato; Etil-octadecanoato e Tetrapentacontano.

Palavras-chave: extrato, diclorometano, metabólitos secundários, herbicidas naturais.

ABSTRACT

Current methods of controlling weeds have caused a dissatisfaction of social order, for putting at risk the quality of food for human or animal. Faced with this problem, associated with the appearance of more resistant species to current herbicides, it is necessary to find new methods of control. This paper describes a phytotoxic evaluation of diclorometanólico extract of leaves of *Curatella americana* (lixeira) in order to evaluate their efficiency in relation to the inhibition of seed germination of *Panicum maximum* (capim-colonião), in boxes Gerbox and greenhouse and the subsequent *Panicum maximum* characterization of allelopathic compounds responsible for inhibition. Were conducted germination, with a photoperiod of 10 hr for 7 days and with solutions of the extracts at concentrations of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 ppm. The extract showed a high potential phytotoxic at concentrations similar to those used by commercial herbicides. In the qualitative identification of secondary metabolites present in the extract diclorometanólico sheet *Curatella americana* L. identificate flavonoids, anthraquinone aglycones, triterpenes, steroids, polyphenols and tannins. Identification the extract in Cromatography Gas: 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, 2-Hexadeciloxirano; 1-(+)-ascorbic acid2,6-dihexadecanoate, Ethyl-hexadecanoate, and Ethyl-octadecanoate and Tetrapentacontano.

Keywords: extract, dichloromethane, secondary metabolites, natural herbicides.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ALELOPATIA

Em 1937, o pesquisador alemão Hans Molish estudou o efeito do etileno no crescimento das plantas e cunhou a palavra “alelopatia”, proveniente da união de duas palavras gregas “allelon” e “pathos”, que significam respectivamente “mútuo” e “prejuízo”. Apesar do significado etimológico da palavra alelopatia, Molish define que o termo engloba tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais entre uma e outra. (EINHELLIG, 1995).

Alelopatia é um fenômeno que ocorre largamente em comunidades de plantas, através da introdução ou liberação de elementos no ambiente. É um dos mecanismos por meio dos quais determinadas plantas interferem no desenvolvimento de outras, alterando-lhes o padrão e a densidade (SMITH, 1989).

A acumulação de substâncias com efeitos alelopáticos tem sido verificada em todos os órgãos vegetais: raiz, caule, folha, flor e frutos, havendo uma tendência de acúmulo nas folhas, sendo que a liberação desses compostos pode ocorrer por exsudação radicular, lixiviação ou volatilização (SOUZA FILHO, 2009).

É importante distinguir os processos de alelopatia e de competição, que são considerados mecanismos opostos, uma vez que a competição envolve a redução ou a retirada de algum fator do ambiente, necessário à outra planta no mesmo ecossistema, tal como água, luz e nutrientes (RICE, 1984).

Recentemente, Miller (1996) classificou o efeito alelopático em dois tipos: autotoxicidade, que ocorre quando plantas de uma espécie liberam compostos químicos que interferem na germinação e/ou crescimento de plantas da mesma espécie; e heterotoxicidade, quando uma planta produz substâncias que são tóxicas para germinação e/ou crescimento de plantas de outras espécies.

Quando o composto liberado causa somente efeitos prejudiciais, recebe também o nome de fitotoxina. Esses compostos podem ser produzidos em qualquer parte das plantas e a sua concentração varia de espécie para espécie e, numa mesma espécie, de acordo com a parte da planta e o seu estágio de desenvolvimento. (RODRIGUES *et al.*, 1992).

Um herbicida pode ser definido como qualquer produto químico que mata ou inibe grandemente o desenvolvimento de uma planta daninha (LORENZI, 1990). O uso

agrícola de herbicidas substituiu a ação humana e mecânica de capina em países desenvolvidos, tendo reduzido enormemente o número de pessoas empregadas na agricultura (BAIRD, 2002).

O grande interesse por estudos fitoquímicos no controle de plantas daninhas, usando produtos naturais modificados e/ou sintéticos que apresentem atividade herbicida e que diferente dos herbicidas usados na atualidade, não provoquem contaminação do solo e plantas e apresentem baixa toxidez às diferentes formas de vida na escala biológica (ZIMDHAL, 1999). Nas últimas duas décadas, os herbicidas tem tido uma utilização crescente na agricultura. Algumas estruturas dos herbicidas citados anteriormente estão apresentadas na Figura 1.

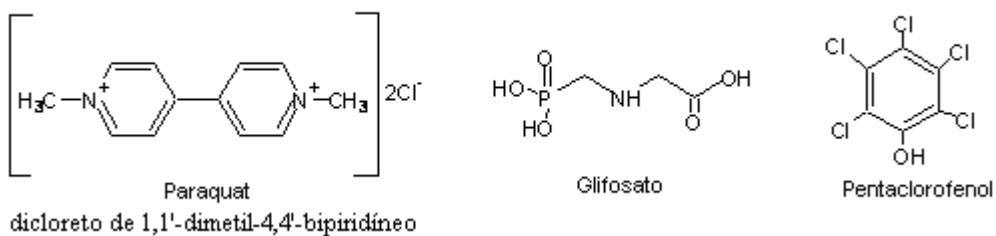


Figura 1: Exemplos de estruturas de herbicidas comerciais.

A grande diversidade da flora brasileira oferece uma grande fonte de metabólitos secundários, os quais podem ter uma aplicação direta, ou como modelos para o desenvolvimento de novos agentes herbicidas.

1.2 – METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados de metabólitos. Vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias. Estas não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida do organismo produtor. A

todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2000).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em alelopatias. (SIMÕES *et al.*, 2000).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários, que variam em qualidade e quantidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles têm suas sínteses desencadeadas por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas (MANO, 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON e ANDERSON, 1998).

Os produtos do metabolismo secundário ou produtos naturais podem ser produzidos por plantas, microorganismos, insetos e outros animais e muitos deles são extraídos e usados como remédios, corantes, perfumes, inseticidas, entre outros usos ou constituem um modelo que o homem utiliza para sintetizar em laboratório substâncias com as mais diversas propriedades. Teoricamente todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar compostos com propriedades alelopáticas (EINHELLIG, 1995).

1.3 - ALELOQUÍMICOS

Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são chamados de aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou apenas produtos secundários e são produzidos pelo metabolismo das plantas.

Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caule e sementes (PUTNAM E TANG, 1986).

Observou-se que para certa quantidade de aleloquímico, o aumento da densidade de plantas diminuía o efeito alelopático, embora tenha aumentado o efeito de competição. Isto porque cada planta dividiu com suas companheiras os efeitos fitotóxicos, de forma que houve atenuação dos efeitos (WEIDENHAMER, 1996).

Os aleloquímicos, que são produtos do metabolismo secundário podem ser relacionados nas seguintes categorias principais (RICE, 1984):

- Ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas; exemplos: ácidos cítrico e acético; metanol e acetaldeído, Figura 2.

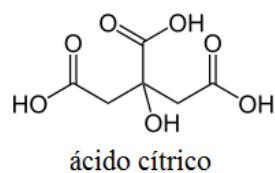
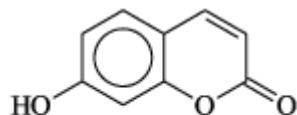


Figura 2: Estrutura química do ácido cítrico (K.PETER, 2001)

- Lactonas insaturadas simples: Várias lactonas simples são fortes inibidoras da germinação de sementes. Exemplo: cumarinas (umbeliferonas) Figura 3:



Umbeliferona

Figura 3: Estrutura química da umbeliferona (K.PETER, 2001)

- Ácido graxo de cadeia longa e poliacetileno. Exemplo ácido esteárico Figura 4.

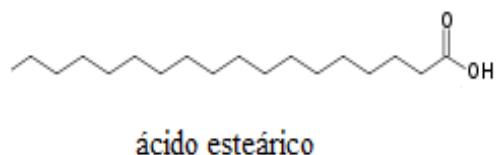


Figura 4: Estrutura química do ácido esteárico (K.PETER, 2001)

- Naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, Figura 5.

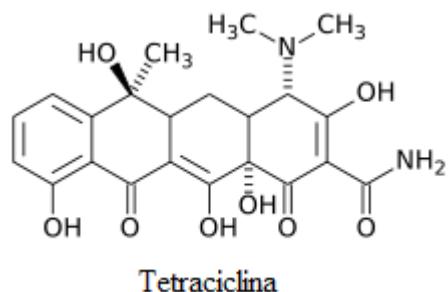


Figura 5: Estrutura química da tetraciclina (K.PETER, 2001)

- Fenóis simples, ácido benzóico e derivados Figura 6.



Figura 6: Estrutura química do ácido benzóico (K.PETER, 2001)

- Ácido cinâmico e derivados Figura 7.

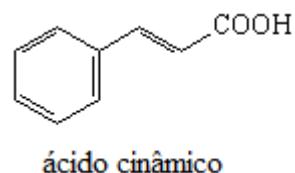
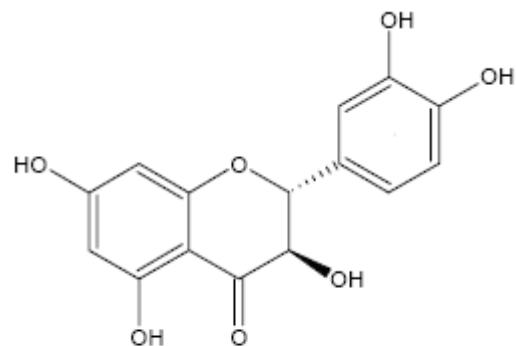


Figura 7: Estrutura química do ácido cinâmico (K.PETER, 2001)

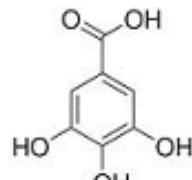
- Flavonóides. Figura 8.



Quecertina

Figura 8: Estrutura química da quecertina (K.PETER, 2001)

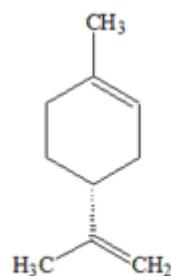
- Taninos hidrolisáveis e condensados: o grupo dos taninos inclui os compostos hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são ésteres de açúcar do ácido gálico enquanto os segundos são complexas misturas de vários ácidos fenólicos. Os taninos hidrolisáveis inibem germinação das sementes, fixação do nitrogênio e o crescimento da planta. (PUTNAM e TANG 1986) Figura 9.



ácido gálico

Figura 9: Estrutura química do ácido gálico(K.PETER, 2001)

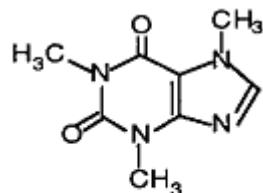
- Terpenóides e fitoesteróis: os monoterpenos que são encontrados em maior quantidade nos óleos de plantas também fazem parte do principal grupo de inibidores Figura 10.



Limoneno

Figura 10: Estrutura química do limoneno (K.PETER, 2001)

- Aminoácidos e polipeptídios; alcalóides e cianoidrinas: Os alcalóides são compostos cíclicos contendo nitrogênio em seus anéis ou cadeias laterais. São particularmente importantes inibidores do tabaco, café e sementes de cacau
- Figura 11.



Cafeína

Figura 11: Estrutura química da cafeína (K.PETER, 2001)

- Sulfetos e glicosídeos: ex: alilisotiocianato.
- Purinas e nucleosídeos.

Ao longo dos anos tem-se comprovado que as plantas produzem substâncias químicas com propriedades alelopáticas que afetam algumas espécies de plantas (especificidade). Tais substâncias são distribuídas em concentrações variadas nas diferentes partes da planta e durante o seu ciclo de vida (periodicidade). Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes, causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microorganismos (CARVALHO, 1993).

É importante destacar que os efeitos benéficos dos metabólitos secundários de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que essas substâncias podem ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no meio ambiente (VOLK *et al.*, 2005; RIGANO *et al.*, 2006; CUNICO *et al.*, 2006; ALÍAS *et al.*, 2005). Ademais, vale a pena ressaltar que o efeito alelopático depende de um composto que é adicionado ao ambiente (WEIDENHAMER *et al.*, 2004). Nesse sentido, uma planta na pastagem pode afetar o crescimento da outra, sem que ocorra o efeito alelopático, mediante competição por fatores do ambiente, tais como água, luz e nutrientes (RODRIGUES *et al.*, 1992).

Os aleloquímicos podem ser liberados no ambiente através de processos ecológicos como, a volatilização, a lixiviação, exsudação radicular e a decomposição de

resíduos de plantas no solo (RICE, 1984). A volatilização é comum em plantas aromáticas e os aleloquímicos volatilizados são de difícil detecção ou identificação. O processo de lixiviação consiste na remoção de substâncias químicas das plantas vizinhas pela ação da água através da chuva, orvalho ou neblina. No solo estas substâncias podem sofrer degradação ou ação de microorganismos.

A exsudação radicular é muito importante, especialmente quando associada ao efeito de microorganismos no solo, que podem ter efeito direto com as raízes de outras plantas ou simplesmente ficar acumulada no solo (REIGOSA *et al.*, 1999).

Toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microrganismos. Perdas da integridade de membranas celulares permitem a liberação de um grande número de compostos que impõem toxicidade aos organismos vizinhos, tais como os glicosídeos cianogênicos, ácidos fenólicos, cumarinas e flavonóides (SOUZA, 1988). Segundo Almeida (1988) o processo de decomposição de produtos vegetais é decorrente do rompimento de tecidos de células ou extravasamento de conteúdo celular. No entanto, a atividade destes produtos no solo é normalmente transitória, uma vez que está sujeita à adsorção pelos colóides, degradação, inativação ou transformação pelos microorganismos.

1.4 – HERBICIDAS SINTÉTICOS X BIOHERBICIDAS

Herbicidas sintéticos têm causado resistência em plantas daninhas e danos à população e ao meio ambiente. Assim, é necessário buscar herbicidas alternativos mais seletivos e menos prejudiciais ao homem e ao meio (VYVYAN, 2001).

Espécies que inibem ou mesmo estimulam a germinação e o crescimento de outras espécies, têm valor significativo na agricultura na busca de herbicidas seletivos, produzindo menor impacto ambiental e resíduos inócuos ao homem (BASTIDA, 2008).

Os agrotóxicos representam os produtos químicos mais amplamente encontrados em corpos hídricos superficiais e subterrâneos do mundo todo, em função do amplo uso em áreas agrícolas e urbanas. Eles compreendem uma variedade de moléculas com distintas propriedades que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potenciais tóxico, carcinogênico, mutagênico ou algum efeito endócrino a diversos organismos não-alvos, inclusive o ser humano (ARMAS, *et al* 2007).

Segundo Miranda *et al* (2007), os gastos mundiais com agrotóxicos, entre 1983 e 1997, aumentou de 20 para 34 bilhões de dólares por ano e produzem, a cada ano, segundo a OMS, entre três a cinco milhões de pessoas contaminadas.

Dias (2006) relata que a pesquisa de metabólitos secundários como fonte de bioherbicidas além de eventuais vantagens ambientais, tem como principal atrativo a possibilidade de aumentar o número ainda relativamente reduzido de locais de ação de herbicidas. Diversos estudos têm mostrado eficiência na aplicação de extratos e inibição ou mesmo redução na velocidade de germinação de espécies.

De acordo com Ferreira (2009) a atividade biológica dos herbicidas ocorre de acordo com sua absorção, metabolismo e a sensibilidade da planta a este herbicida e, ou, a seus metabólitos. Assim, o fato de um herbicida atingir as folhas ou ser aplicado no solo, não é suficiente para que ele exerça a sua ação. Há necessidade de que ele penetre na planta e atinja a organela onde atuará.

1.5 – DISTRIBUIÇÃO E OCORRÊNCIA DO *Panicum maximum* Jacq. (Capim-colonião)

Conhecido vulgarmente como capim-colonião, esta planta é cientificamente denominada *Panicum maximum* Jacq. Têm-se efetuado hibridações artificiais e muitos híbridos tem se apresentado com características peculiares.

No Brasil, as primeiras introduções foram feitas no tempo da escravatura. Através dos anos muitas variedades e cultivares têm sido introduzidos. Hoje, plantas dessa espécie são encontradas em quase todo o território nacional. As vantagens positivas apresentadas são que se trata de uma das melhores forrageiras para regiões quentes e produz enorme quantidade de massa verde, durante todo o ano.

As sementes são apreciadas por diversos tipos de pássaros. As desvantagens são que pela agressividade e resistência esta espécie é considerada infestante em mais de vinte tipos de culturas. A cultura mais afetada é a da cana-de-açúcar.

1.6 – DISTRIBUIÇÃO E PROPRIEDADES DE *Curatella americana* L. (Lixeira)

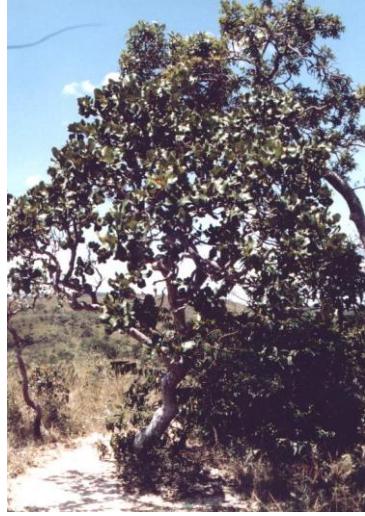
O cerrado, a segunda maior formação vegetal do Brasil, apresenta grande diversidade fisionômica e florística em seus domínios. As variações fisionômicas do cerrado produzem um gradiente, em densidade e altura, definido por formações campestres a florestais (COUTINHO, 1978).

A família Dilleniaceae possui 12 gêneros e cerca de 310 espécies, compreendendo árvores, arbustos, subarbustos eretos ou escandentes, lianas lenhosas, raramente ervas (AYMARD, 1998). No Brasil está representada por cinco gêneros e cerca de 40 espécies e o gênero *Curatella Linn*, com apenas um representante, *Curatella americana* L.

A *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) é uma planta característica do Cerrado (LORENZI, 1992) e, assim como grande parte das plantas desse bioma, por questões bióticas ou abióticas, possui folhas coreáceas e diversas estruturas de defesa (FERNANDES, 1998). Além dessas, uma das características mais marcantes é sua folha áspera ao tato, que a proporcionou o nome popular de “lixeira” (SILVA-JUNIOR, 2005). Segundo Turner (1994), esta característica em vegetais está relacionada com a conservação de água; com a conservação de nutrientes ou com a defesa contra herbívoros.

A *Curatella americana* L. é conhecida popularmente como lixeira, sambaíba, cajueiro-bravo, caimbé, folha-de-lixa, cambarba e marajoara. Segundo a Tabela 1 a planta apresenta porte de árvore, típica do cerrado, atinge cerca de 6 a 10 metros de altura (Figura 12). O tronco possui uma casca grossa acinzentada que se desprega em placas, (Figura 13).

Tabela 1: Partes da planta *Curatella americana* L.

	
Figura 12: Árvore do Cerrado	Figura 13: Tronco com casca
	
Figura 14: Folhas ásperas	Figura 15: Ramo florido

Fonte: rede sementes do cerrado

As folhas são ovaladas, atingem até 26 cm de comprimento, são suavemente torcidas, quebradiças, de cor verde e superfície muito áspera Figura 14. Antigamente, foram muito utilizadas para "arear" panelas em função da elevada quantidade de sílica presente na superfície áspera.

As inflorescências são curtas, contendo de 10 a 20 flores pequenas (5 mm) de cor amarelo-pálido Figura 15. Os frutos abrem espontaneamente expondo 3 a 5 sementes castanhas cobertas por uma estrutura carnosa de cor branca que contrasta com a coloração interna do fruto que é avermelhada (LORENZI, 1990). Floresce de junho a

outubro e frutifica de julho a dezembro, estando os frutos maduros principalmente em outubro e novembro.

Suas características morfológicas a tornam adequada para uso em paisagismo e quando está em floração atrai grande quantidade de abelhas.

Apresenta usos: madeireiro; medicinal; melífero; ornamental; tanífero (ALMEIDA *et al.*, 1998).

2 - OBJETIVOS

Visando a caracterização fitoquímica e a avaliação alelopática do extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L., os objetivos deste trabalho foram:

1. Comprovar a atividade alelopática do extrato em diclorometano mediante a avaliação do seu efeito inibitório na germinação de sementes e desenvolvimento de raiz e parte aérea (caule) de *Panicum maximum* Jacq. (capim colonião).
2. Identificar qualitativamente os metabólitos secundários presentes no extrato através de ensaios químicos e por meio de cromatografia de camada delgada.
- 3 - Identificar os compostos químicos voláteis, presentes no extrato em diclorometano responsáveis pelo comportamento inibitório através de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

3 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Moinho de facas rotativas;
- Estufa para Esterilização e Secagem Gehaka G4023D;
- Compressor Aspirador Fanem 089-cal, 550W;
- Evaporador rotativo Buchi – Waterbath B-480;
- Balança analítica eletrônica Gehaka BG 200;
- Papel de Filtro Qualitativo 12,5cm;
- Funil de placa porosa fina 10 a 16 μ ;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Balões Volumétricos de 50 mL;
- Béquer de vidro de 100 mL;
- Placa de Petri;
- Espátulas metálicas e plásticas;
- Tubos de ensaio de vidro;
- Agitador de tubos (marca: Phoenix AP56);
- Caixas gerbox (dimensões: 11x 11 cm);
- Câmara Germinadora Novatecnica NT708;
- Sementes de *Panicum maximum* fornecidas pelo Laboratório de Solos - Agronomia UFU;
- Placas de sílica gel para cromatografia em camada delgada;
- Luz UV 254 nm e luz UV 365 nm ;
- Reagentes para Testes Fitoquímicos (reagente de Mayer, Wagner, Dragendorff, Baljet, Kedde, Raymond-Marthoud, Liebermann-Burchard, Salkowski e Citrobórico Borntrager);
- Reagentes (AcOEt, ácido fórmico, AcOH, água destilada, NH₄OH 10%, MeOH, tolueno, dietilamina, CH₂Cl₂, solução etanólica de AlCl₃ 5%, éter, KOH 5% em etanol, butanol, vanilina em etanol 10%, hexano, solução etanólica de cloreto férrico a 2% e KOH 10% em etanol);
- Equipamento CG/EM-QP2010 - Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas.

4 – METODOLOGIA

4.1 – COLETA DO MATERIAL

Folhas de *Curatella americana* L. foram coletadas de uma propriedade rural no município de Uberlândia-MG. Estas foram selecionadas e em seguida, lavadas apenas com água. Após a lavagem, as folhas foram colocadas em estufa para secar, a temperatura da estufa não ultrapassou 40°C, a fim de evitar a degradação de substâncias.

O material seco foi triturado em um moinho de facas e peneirado (malha de 0,5 mm aproximadamente) até obtenção de um pó homogêneo. O pó obtido foi utilizado imediatamente para a preparação do extrato em diclorometano.

4.2 - OBTEÇÃO DO EXTRATO

Para obtenção do extrato foram usadas 474,62g do pó homogêneo obtido imerso em 2,0 litros de diclorometano, por um período de agitação a cada 12 horas, durante sete dias. Após o período de agitação, a mistura foi filtrada em funil de placa porosa fina à pressão reduzida, posteriormente concentrado e transferido para uma placa de Petri. O extrato obtido ficou conservado em geladeira à 5°C até a finalização dos testes. Calculou-se o rendimento do extrato.

4.3 - PREPARO DAS SOLUÇÕES

4.3.1 – ENSAIOS DE GERMINAÇÃO EM CAIXAS GERBOX E EM CASA DE VEGETAÇÃO

Deste extrato foram preparadas 50 mL de soluções aquosas de cada concentração: zero (controle), 50, 100, 150, 200 e 250 ppm.

Primeiramente, pesou-se a quantidade necessária de extrato para cada solução e acrescentaram-se duas gotas de dimetilformamida para sua dissolução. Esta mesma quantidade do solvente foi acrescentada ao controle. Em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico de 50 mL com água bidestilada e deionizada. Estas

soluções foram utilizadas para ensaios de germinação em caixas gerbox (dimensões 11x11cm).

As soluções aquosas de concentrações zero (controle), 100, 200 e 400 ppm foram utilizadas em casa de vegetação.

4.3.2 – REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. (Apêndice I)

4.4 – ENSAIOS DE GERMINAÇÃO EM CAIXAS GERBOX

Primeiramente, foi realizada a quebra de dormência das sementes de *Panicum maximum* Jacq. com ácido sulfúrico, durante 5 minutos. Em seguida foram pré-selecionadas e esterilizadas durante 2 minutos com hipoclorito de sódio, em uma solução de 10%. As caixas gerbox (dimensão 11x11cm) também foram previamente esterilizadas.

Cada caixa gerbox foi constituída de um papel de filtro, 20 sementes enfileiradas e 10,0 mL de solução para cada concentração. Para a verificação da atividade alelopática foram utilizadas, por triplicata, concentrações de: zero (controle), 50, 100, 150, 200 e 250 ppm do extrato. Além de 2 gotas de dimetilformamida em cada solução inclusive o controle.

As caixas foram transferidas para um germinador onde permaneceram por sete dias, à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 10 horas. Durante este período não foi necessário irrigá-las, pois não houve o ressecamento do papel de filtro.

4.5 – ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Os bioensaios feitos em condições de casa de vegetação tiveram o mesmo período de germinação, com temperatura mínima de 20°C e máxima de 30°C, usando soluções obtidas a partir do extrato bruto em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L.

Em recipientes plásticos de 300,0 mL contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1 foram cultivadas sementes de *Panicum maximum* Jacq. Este substrato foi

autoclavado por 1 hora a 120°C. Em cada caixa foram colocadas 40 sementes de *Panicum maximum* Jacq.

Dez dias após a semeadura, foram retirados os espécimes com tamanhos diferentes para se manter em padrão regular. No 18º dia após a semeadura foram adicionados em triplicata, 10,0 mL de cada solução, nas concentrações: zero (controle), 100, 200 e 400 ppm em cada recipiente.

No 25º dia (uma semana após a aplicação dos extratos), as espécies foram retiradas, com cuidado e efetuadas as mediadas da raiz, do caule e da parte aérea da espécie alvo para quantificação dos resultados.

4.6 - CLASSIFICAÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários foram classificados pelo reconhecimento de grupos funcionais, usando diferentes reativos (os grupos funcionais foram caracterizados de acordo com os procedimentos descritos por Ugaz, 1994):

a) Alcalóides

Levou-se à secura 30,0 mL de extrato em diclorometano da planta, adicionaram-se 5,00 mL de HCl (10%) e esquentou-se por 10 minutos. Esfriou-se, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em três tubos de ensaios e colocaram-se algumas gotas dos reativos de reconhecimento: Dragendorff, Mayer e Wagner. Uma leve turbidez ou precipitado (respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidencia a possível presença dos mesmos.

b) Glucosídeos Cardiotônicos

A 10,0 mL de extrato em diclorometano da planta adicionaram-se 5,0 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e 4,0 mL de água destilada. Esquentou-se a mistura em banho-maria durante 10 minutos. Filtrou-se. O filtrado foi adicionado em 20,0 ml de clorofórmio e agitado. Separou-se a fase clorofórmica em 6 tubos de ensaio, levando à secura. Adicionou-se:

- Ao primeiro tubo, 1,0 mL de Reativo de Baljet. Coloração roxa, laranja-roxeada ou violeta são glucosídeos cardiotônicos.
- Ao segundo, 1,0 mL de Reativo de Kedde. Coloração rosa ou azul-violeta ao visível indica cardenólidos. Os bufadienólidos não reagem. A cor se atenua em poucos minutos.
- Ao terceiro, 1,0 mL de Reativo de Raymond-Marthoud. Coloração roxa, laranja-roxeada ou violeta indicam a presença de anéis lactônicos dos cardenólidos.
- No quarto, realizou-se a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, uma gota de cloreto férrico a 5% em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Colorações intensas.
- No quinto, realizou-se a reação de Liebermann-Burchard cerca de 1,0 mg da amostra/ algumas gotas de ácido acético + 3,0 mL anidrido acético/ ácido sulfúrico (50:1, v/v). Coloração verde, azul esverdeado, roxo a azul.
- No sexto, realizou-se a reação de Salkowski para a determinação de núcleo esteroidal. Coloração: amarelo-roxo sangue.

c) Cumarinas voláteis

Em um tubo de ensaio colocou-se 2,0 mL de extrato em diclorometano da planta, tampou-se com papel de filtro impregnado com solução diluída de NaOH e levou-se a banho de água a 100° C por alguns minutos. Removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob luz UV, fluorescência amarela indicaria a presença de cumarinas.

d) Flavonóides

Colocou-se em um tubo, 2,0 mL do extrato em diclorometano, alguns fragmentos de Mg e agregou-se, pelas paredes do tubo, algumas gotas de HCl diluído. Observou-se a coloração, que varia para as diferentes estruturas.

e) Taninos

Evaporaram-se 5,0 mL do extrato em diclorometano e dissolveu-se o resíduo em 10,0 mL de água destilada. Filtrou-se. A 3,0 mL do extrato aquoso, adicionou-se 1 ou 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

f) Saponinas

Evaporaram-se 5,0 mL do extrato em diclorometano 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.

g) Triterpenos e/ou esteróides

Levou-se à secura 10,0 mL do extrato em diclorometano da planta, adicionaram-se 10,0 mL de clorofórmio, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em duas porções. Em cada tubo realizaram-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski.

h) Derivados antracênicos livres: quinonas

Colocou-se em um tubo de ensaio cerca de 0,20 g do extrato em diclorometano e adicionaram-se 5,0 mL de clorofórmio e 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 1,0 mL de solução aquosa de NaOH a 5%. Coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas (Reação de Borntraeger).

No segundo tubo, adicionou-se 1,0 mL de solução de acetato de magnésio a 5 % em metanol. Coloração roxa indica a presença de antraquinonas livres.

4.7 - CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Descrição dos testes realizados na prospecção fitoquímica de folhas de *Curatella americana* L. (WAGNER, 1984).

a) Flavonóides

Para identificação de flavonóides presentes, 1g de *Curatella americana* L. foi extraído por aquecimento em banho-maria durante 15 minutos com 5,0 ml de MeOH. O filtrado obtido foi então analisado por ccd.

Aplicou-se os filtrados em placas de sílica gel, procedendo-se a eluição com ACOET/ ácido fórmico/ AcOH / água (100,0 mL:11,0 mL:11,0 mL:26,0 mL), misturando-se primeiro AcOEt / ácido fórmico / AcOH (a água foi adicionada em seguida, devagar e com agitação vigorosa).

Segundo Wagner, 1984, a revelação sob luz UV_{254 nm}, os flavonóides aparecem como manchas azuis escuras em fundo amarelo e, sob luz UV_{365 nm}, dependendo do tipo de estrutura do flavonóide, apresentam fluorescências amarelas, azuis ou verdes. Em solução etanólica de AlCl 5% os flavonóides aparecem como manchas de fluorescência amarela e/ou esverdeada.

b) Alcalóides

Na identificação de alcalóides presentes, 1g de *Curatella americana* L. foi misturado com 1 ml de solução de NH₄OH 10% e, então, extraído por 15 min. a 60°C com 5,0 ml de MeOH. O filtrado foi então usado para cromatografia em camada delgada, aplicado em placas de sílica gel, eluídas com tolueno/ AcOEt/ dietilamina (70,0 mL: 20,0mL: 10,0 mL).

Segundo Wagner (1984), muitos alcalóides mostram fluorescência sob luz UV_{254 nm} e sob luz UV_{365 nm}, alguns apresentando fluorescência azul e/ou amarela. Em solução de Dragendorff apresentam manchas alaranjado-marrons.

c) Cumarinas

Para detectar a presença de cumarinas, 1g de *Curatella americana* L. foi extraído sob aquecimento e refluxo, por 15 min., com 10,0 mL de CH₂Cl₂. O filtrado foi então evaporado até a secura e o resíduo dissolvido em 1,0 mL de tolueno.

A solução obtida foi aplicada em placas de sílica gel com:

1°) Tolueno: éter(1:1) saturado com AcOH 10% aq.

Obs: a mistura (50,0 mL + 50,0 mL) dos solventes foi colocada com 50,0 mL AcOH 10% em um funil de separação e posteriormente decantada.

2°) AcOEt(para confirmação)

De acordo com Wagner (1984), revelando-se sob luz UV_{254 nm} todas as cumarinas mostram fluorescência distinta. Sob luz UV_{365 nm} todas as cumarinas simples mostram fluorescência intensa azul/verde. Em presença de KOH 5% em etanol, intensa fluorescência azul/marrom sob luz UV_{365 nm}.

d) Saponinas

Para detectar presença de saponinas, cerca de 1,0 g de *Curatella americana* L. foi extraído separadamente por aquecimento em banho-maria, por 15 min. Com 5,0 mL de MeOH. O filtrado foi reduzido até 1,0 mL e misturados com 0,5 mL de H₂O e, então, extraído com 3,0 mL de butanol. A fase butanólica obtida foi, então, aplicada em placas de sílica gel 60, utilizando como eluentes: CHCl₃/MeOH/H₂O (64,0 mL:50,0 mL:10,0 mL).

Revelando-se com solução de vanilina em etanol 10%, saponinas mostram o aparecimento de manchas azuis, violetas azuis e algumas vezes amarelas no visível (WAGNER, 1984).

e) Polifenóis e taninos

Utilizando-se aproximadamente 1,0 g de *Curatella americana* L. foi extraído por aquecimento em banho-maria, por 15 min., com 5,0 mL de MeOH. O filtrado obtido foi aplicado em placas de sílica gel 60, eluindo-se com hexano/ AcOEt (1:1), tolueno/ butanol/ AcOH/ H₂O (50,0 mL: 25,0 mL: 25,0 mL: 5,0 mL).

A revelação foi efetuada com solução etanólica de cloreto férrico a 2% (WAGNER, 1984).

Polifenóis: apresentam manchas de coloração diversas (castanho-avermelhadas, violetas, verdes, azuis).

Taninos: as manchas apresentam coloração negro-azulada ou esverdeada.

f) Agliconas antraquinônicas

Após extração de cerca de 1,0 g de *Curatella americana* L., por aquecimento em banho-maria, durante 15 minutos com 5,0 mL de MeOH, o extrato foi aplicado em placas de sílica gel, procedendo-se a eluição com AcOEt/ MeOH/ H₂O (100,0 mL: 17,0 mL: 13,0 mL).

A revelação sob luz UV_{254 nm}, todos os derivados de antraquinonas mostram fluorescência, enquanto que, sob luz UV_{365 nm}, todos os derivados dão fluorescência amarelo/ vermelho/ marrom.

Após tratamento com reagente de Borntrager (KOH etanólico 10%) aparecem manchas vermelhas no visível e fluorescência vermelha sob luz UV_{365 nm}, de antraquinonas ou manchas amarelas no visível e fluorescência amarela sob luz UV_{365 nm}, de antronas e antranóis (WAGNER, 1984).

g) Triterpenos/ esteróides

Para se evidenciar a presença de esteróides e triterpenos, cerca de 2g de *Curatella americana* L. foram extraídos com 20,0 ml de CHCl₃/ AcOH (99,0 mL; 1,0 mL) em banho-maria por 15 minutos. Os filtrados obtidos foram aplicados em placas de sílica gel 60 usando como eluentes: hexano/ AcOEt (1:1).

No caso de reação positiva observa-se uma sucessão de cores, de róseo ao azul e verde. Revelador: Lieberman-Burchard (WAGNER, 1984).

4.8 – CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

Em parceria com a Universidade Federal de Ouro Preto, utilizando um aparelho modelo GCMS-QP2010 da marca Shimadzu, com uma coluna capilar RTX-5MS (RESTEK) de 30 m, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de filme, foi feita a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. O programa de temperatura foi de 60- 240°C ($3^{\circ}\text{C min}^{-1}$), 240°C (10 min). A energia de impacto foi de 70 eV e foram captados os fragmentos de 40 a 650 m/z. Foi injetado um microlitro de amostra dissolvido em diclorometano. A identificação dos compostos foi feita por meio das bibliotecas de espectros de massas de NIST.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes de germinação pré e pós-emergentes bem como prospecção fitoquímica para classificação de algumas classes relevantes quanto ao efeito alelopático de folhas de *Curatella americana* L.

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO

Na obtenção do extrato foram usadas 474,62 g de folhas secas de *Curatella americana* L. em 2 litros de diclorometano, obtendo-se 37,49 g de extrato seco e concentrado. O extrato apresentou um rendimento de 7,9%.

5.2 GERMINAÇÃO EM CAIXAS GERBOX

Após o período de germinação, mediu-se o comprimento da parte aérea e das raízes para a determinação da porcentagem de inibição em relação ao controle. Determinou-se também a porcentagem de sementes que germinaram para verificar se houve inibição no desenvolvimento das sementes.

Conforme a Figura 16, para a germinação nas concentrações 50 e 100 ppm houve um favorecimento de 2 a 5%. Isto se deve ao fato, do extrato ter beneficiado o desenvolvimento das sementes, nas duas concentrações ao invés de prejudicar. Porém, nas demais concentrações houve apenas inibição, variando de 48% em 150 ppm a 100% em 200 e 250 ppm. Verificando assim, que acima de 150 ppm houve total inibição pré-emergente.

Para o desenvolvimento da raiz verificou-se um estímulo de 22% em apenas 50 ppm, nas demais concentrações ocorreram inibições de 59% em 100 ppm, 93% em 150 ppm e 100% em 200 e 250 ppm.

Com relação ao desenvolvimento da parte aérea observou-se inibição em todas as concentrações chegando a 100% em 200 e 250 ppm. Houve favorecimento apenas nas concentrações de 50 e 100 ppm. Nos parâmetros raiz e parte aérea ocorreram aumento na inibição com o aumento da concentração.

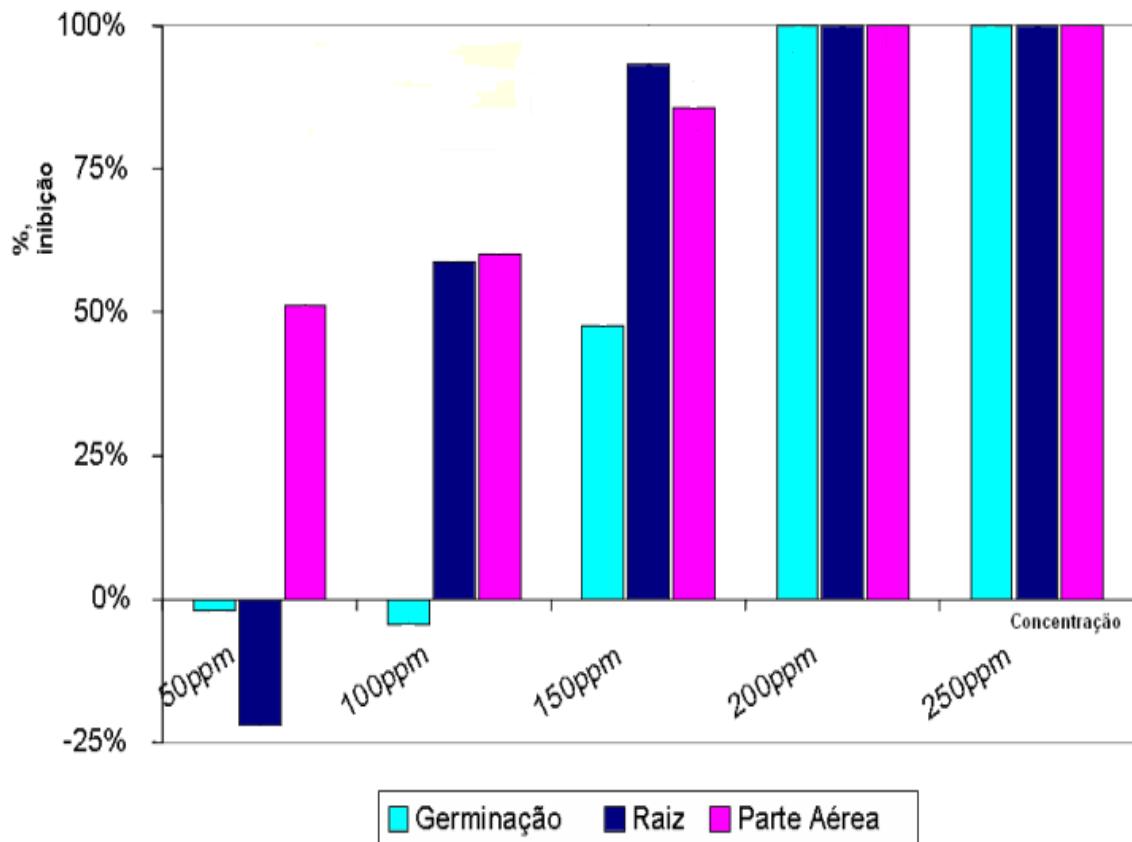


Figura 16. Efeitos da concentração do extrato em diclorometano das folhas de *Curatella americana* L. no desenvolvimento de sementes de *Panicum maximum* Jacq. em caixas gerbox.

Estudos feitos com *Cenchrus echinatus* (timbete) e *Origanum majorana* L. (catinga de mulata) também apresentaram resultados significativos de inibição destas plantas em sementes de *Panicum maximum* Jacq. (SANTOS, 2007)

Segundo Santos 2007, a Figura 17 apresenta os resultados obtidos da germinação e desenvolvimento das sementes de *Panicum maximum* Jacq. em presença do extrato metanólico de caule de timbete. Analisando o gráfico da Figura 17, observa-se que o extrato metanólico de caule de *Cenchrus echinatus* (timbete), mostrou considerável inibição sobre o *Panicum maximum* Jacq. notavelmente com 100 ppm do extrato, resultado um pouco melhor que o extrato das folhas da lixeira que a total inibição foi a partir de 150 ppm. O aumento no crescimento da raiz e na germinação foi apenas em 25 ppm com o timbete. Já no crescimento da parte aérea, ambos os extratos apenas inibiram, sem nenhum efeito benéfico.

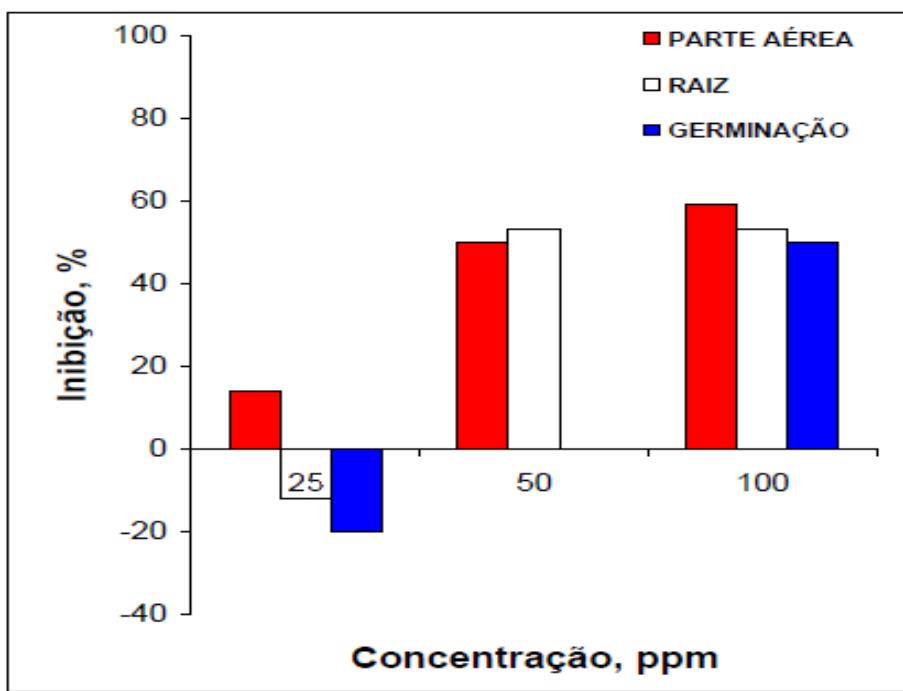


Figura 17: Efeitos da concentração do extrato metanólico de caule de *Cenchrus echinatus* no desenvolvimento de sementes de *Panicum maximum* Jacq.

Segundo Alves 2009, na Figura 18 encontram-se os resultados obtidos da germinação e desenvolvimento das sementes de *Panicum maximum* Jacq. em presença do extrato em diclorometano do caule de *Origanum majorana* L.

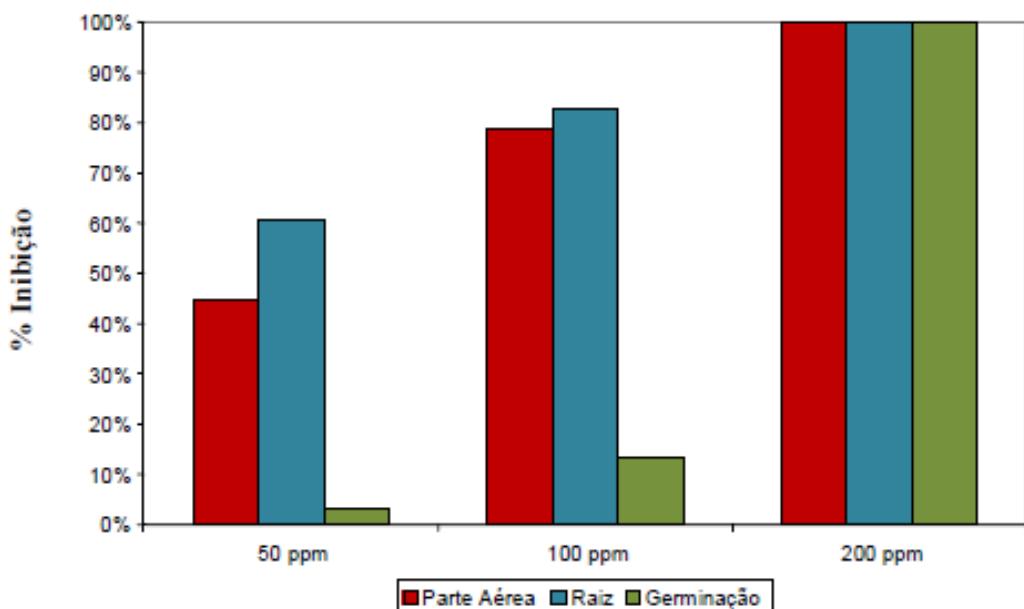


Figura 18: Ensaio de germinação do caule de *Origanum majorana* L.

Comparando os resultados dos extratos em diclorometano do caule de *Origanum majorana* L. e das folhas de *Curatella americana* L pode-se dizer que ambos atingiram 100% de inibição em 200 ppm nos parâmetros: raiz, parte aérea e germinação. No entanto, *Origanum majorana* L. apresentou apenas inibição em todas as concentrações, sem nenhum efeito benéfico.

5.3 CASA DE VEGETAÇÃO

Após o período de semeadura e em seguida aplicação dos extratos, mediu-se o comprimento da parte aérea e raiz da espécie alvo para a quantificação dos resultados, conforme a Figura 19:



Figura 19: Foto do *Panicum maximum* Jacq. no ensaio pós-emergente realizado em casa de vegetação.

Além disso, determinou-se a porcentagem de inibição pós-emergente como mostra a Figura 20:

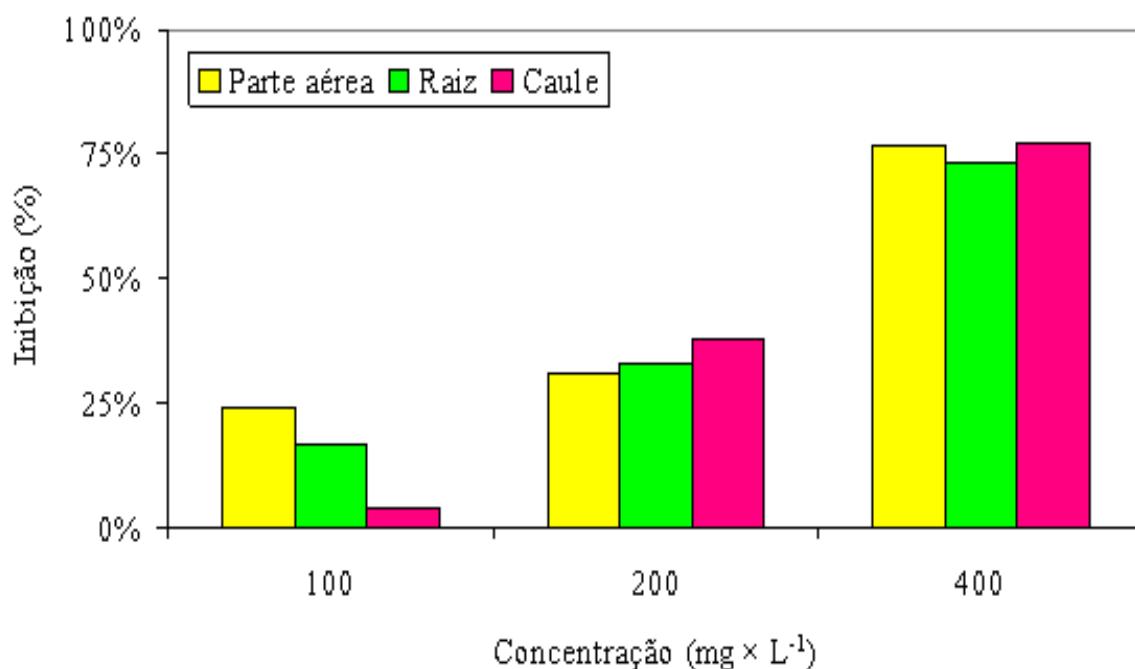


Figura 20: Efeitos da concentração do extrato em diclorometano das folhas de *Curatella americana* L. no desenvolvimento de sementes de *Panicum maximum* Jacq. em casa de vegetação.

Para o desenvolvimento da parte aérea houve apenas inibição, variando de 24% em 100 ppm, 35% em 200 ppm e chegando a 80% em 400 ppm. Na raiz a inibição variou de 15% em 100 ppm, 37% em 200 ppm e 75% em 400 ppm. Com relação ao desenvolvimento do caule a inibição variou de 3% em 100 ppm, 45% em 200 ppm e chegando a 80 % em 400 ppm. Observou-se inibição em todas as partes da planta, ou seja, em nenhuma concentração houve favorecimento na parte aérea, raiz e caule.

O extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L. apresentou inibição das sementes de *Panicum maximum* Jacq. tanto no ensaio pré-emergente, quanto no ensaio pós-emergente, conforme as Figuras 16 e 20.

5.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na prospecção fitoquímica da folha de *Curatella americana* L., classificados por Cromatografia em Camada Delgada e pela classificação qualitativa de metabólitos secundários proposta por Ugaz, 1994.

Tabela 2: Testes de prospecção fitoquímica nas folhas de *Curatella americana* L

Classes de compostos orgânicos	Reagente	Folha
Flavonóides	AlCl ₃ 5%	positivo
Alcalóides	Dragendorff	negativo
Cumarinas	KOH 5%	negativo
Agliconas antraquinônicas	Borntrager	negativo
Triterpenos	Lieberman-Buchard	positivo
Esteróides	Lieberman-Buchard	positivo
Saponinas	Vanilina	negativo
Polifenóis	Cloreto férreo 2%	positivo
Taninos Condensados	Cloreto férreo 2%	positivo

No extrato diclorometanólico das folhas de *Curatella americana* L. foram encontrados flavonóides, pertencentes à classe de compostos fenólicos, que segundo Buchanan (2001), são metabólitos secundários conhecidos por possuírem ação antipatogêna ou inseticida. E há inclusive certas espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática).

Triterpenos/esteróides foram encontrados e segundo Correia (2006), são substâncias que podem ser precursores de hormônios em plantas, insetos e mamíferos e inibem o desenvolvimento de outras plantas.

Também foram encontrados polifenóis e taninos condensados, nas folhas de *Curatella americana* L., e estes são conhecidos por inibição de crescimento e germinação de sementes (BUCHANAN, 2001).

5.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L. foi injetado no equipamento GCMS-QP2010 e obteve-se o cromatograma como mostra a Figura 21:

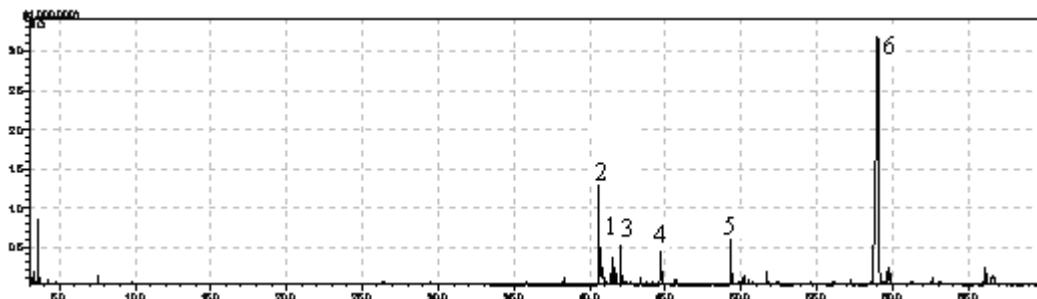
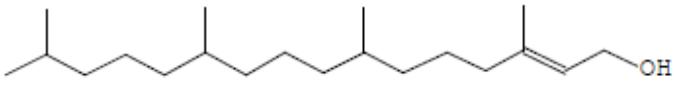
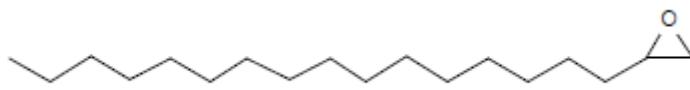
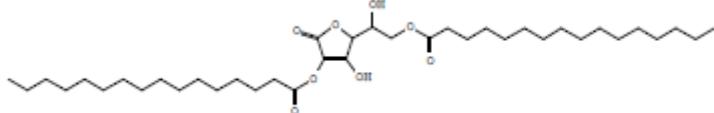
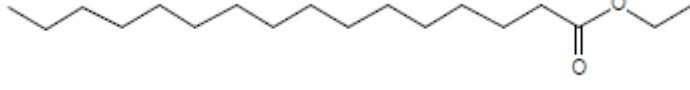
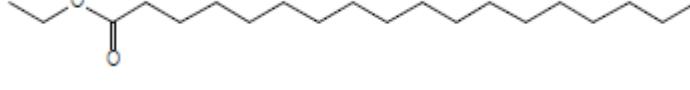
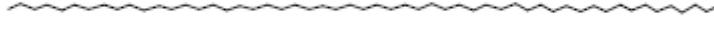


Figura 21: Cromatograma obtido por CG/EM.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos na identificação de compostos voláteis, usando como solvente extrator diclorometano, o extrato ativo foi analisado através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Além disso, apresenta os compostos identificados e suas respectivas estruturas.

Tabela 3: Compostos identificados por CG/EM, com suas respectivas estruturas e fórmulas moleculares.

Fórmula molecular / T.R	Estrutura / Composto
Pico 1 $C_{20}H_{40}O$ T.R: 41.467	 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol.
Pico 2 $C_{18}H_{36}O$ T.R: 40.842	 2-Hexadeciloxirano
Pico 3 $C_{38}H_{68}O_8$ T.R: 42.201	 1-(+)-ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato
Pico 4 $C_{18}H_{36}O_2$ T.R: 44.862	 Etil-hexadecanoato
Pico 5 $C_{20}H_{40}O_2$ T.R: 49.305	 Etil-octadecanoato
Pico 6 $C_{54}H_{110}$ T.R: 57.990	 Tetrapentacontano

6. CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam a presença de compostos químicos com potencial herbicida no extrato diclorometanólico de folha de *Curatella americana* (lixeira). Este apresentou um elevado potencial fitotóxico, em concentrações semelhantes à utilizadas pelos herbicidas comerciais.

Os principais metabólitos secundários identificados no extrato foram flavonóides, agliconas antraquinônicas, triperpenos, esteróides e taninos.

Os possíveis componentes responsáveis pela atividade inibitória, presentes na fração diclorometano, identificados através de CG-EM, foram: 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol; 2-Hexadeciloxirano; 1-(+)-ácido ascórbico2,6-dihexadecanoato; Etil-hexadecanoato; Etil-octadecanoato e Tetrapentacontano. Os demais picos não foram identificados

Portanto, este estudo verificou o potencial alelopático do extrato em diclorometano de folhas de *Curatella americana* L. (lixeira) e o potencial uso desse extrato como herbicida natural, com aplicação alternativa aos comerciais e com melhor seletividade e menor impacto ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÍAS. J. C, SOSA. T, ESCUDERO. J. C, CHAVES. N. Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. **Plant and Soil**, v. 282, p. 327-332, 2005.
- ALMEIDA, F.S. **A Alelopatia e as Plantas.** Londrina, PR, IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná). 60p, ilustrado. (IAPAR. Circular, 53), 1988. 464 págs.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- ALVES, J. N. **Caracterização Química dos Extratos de *Origanum majorana* L. na inibição de *Panicum maximum*.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.
- ARMAS E.D., MONTEIRO R.T.R., ANTUNES P.M., SANTOS M.A.P.F., CAMARGO P.B., Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes; **Embrapa meio ambiente**, 2007.
- AYMARD, G. **Dilleniaceae.** In Flora of the Venezuela Guayana (Berry, P., Holst, B. e Yatskievych, K. Mis. Bot. gard. St. Louis. (eds). V. 4, p. 671-685, 1998.
- BAIRD, C. **Química Ambiental.** Tradução de Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. – 2^a edição - Porto Alegre: Bookman, p.349, 2002.
- BASTIDA A.de J. Oliberos; El fenômeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación em La búsqueda de herbicidas, **Química Viva**, v.7, n.001, p. 2-34, 2008.
- BUCHANAN B. B., GRUISEM W., JONES R.L., Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, 3^a ed., 2001.
- CARVALHO, S. I. C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante.** 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

CORREIA S. J., DAVID J. M., Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae; Quim. Nova, Revisão, v.29, p. 1287-1300, 2006.

COUTINHO, L. M. O conceito de cerrado. Revista Brasileira de Botânica, v. 1, p. 17-23, 1978.

CUNICO. M. M, DIAS. G. J, MIGUEL. D. M, MIGUEL. G. O. Potencial Antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 746-749, 2006.

DIAS L.S.& DIAS A.S., Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas; **Chemical Ecology Unit**, Centro de Ecologia e Ambiente, Universidade de Évora, p.510, 2006.

EINHELLIG, F. A. Allelopathy: Current status and future goals. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. (Ed). **Allelopathy: organisms, processes and applications**. Washington: American Chemical Society, p. 1-25, 1995.

FERNANDES, A. **Fitogeografia brasileira**. Fortaleza, Ceará, Brasil. Editora Multigraf, 1998.

FERREIRA A.F., SILVA A.A., FERREIRA L.R., Mecanismo de ação dos herbicidas, publicações Embrapa, disponível em http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5336.pdf; acesso em: 23/07/2009.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa/ SP. 3^a edição Editora Plantarum, 339 p., 1990.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil**. Nova Odessa, S.P., Editora Plantarum, 1992.

MANO, A. R. O. Efeito Alelopático do extrato aquoso de sementes de camaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, 2006, 102 p.

MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p.854-859, Nov./Dec., 1996.

MIRANDA A.C., MOREIRA J.C., CARVALHO R., PERES F., Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil; **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.7-14, 2007.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; **J. Ethnopharmacol**, v. 25, p. 61-65. 1998.

PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. Allelopathy: state of the science. **The science of Allelopathy**. New York: John Wiley e Sons, p. 1-19, 1986.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 57-608, 1999.

RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, p.423, 1984.

RIGANO, D., GRASSIA, A., FORMISANO. C, BASILE. A, SORBO. S, SENATORE. F. Antibacterial and allelopathic activity of methanolic extract from Iris pseudopumila rhizomes. **Fitoterapia**, v. 77, p. 460-462, 2006.

SANTOS, D. Q. **Potencial herbicida e caracterização química do extrato metanólico da raiz e caule do Cenchrus echinatus (timbete)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

SILVA-JUNIOR, M. C. Cem árvores do Cerrado: guia de campo. Colaboradores: Gilmar Correa dos Santos *et al.* **Editora Rede de Sementes do Cerrado**, 2005.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC. 2^a edição, p.323-325, 2000.

SMITH, A. E. The potential allelopathic characteristics of bitter sneezeweed (*Helenium amarum*). **Weed Science**, Champaign, v. 37, n. 5, p. 665-669, 1989.

SOUZA, I. F. Alelopacia de plantas daninhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n.150, p. 75-78, 1988.

SOUZA FILHO, A.P.S, GUILHON, G.M.S.P, ZOGHBI, M.G.B, CUNHA, R.L. Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de

folhas de Cipó-D'alho (Bignoniaceae). **Planta Daninha**, Viçosa, v.27, n.4, p.647-653, 2009.

TURNER, I. M. Sclerophyll: primarily protective? **Functional ecology**, v. 8, p. 669-675, 1994.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales**. Pub. Univ. Pontificia Católica Del Perú, p. 269-278, 1994.

VOLK. R-B, FURKERT. F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiological Research**, v. 161, p. 180-186, 2005.

VYVYAN J.R., **Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals**; Tetrahedron, v.58, p.1631-1646, 2001.

WAGNER S.B.H., ZGAINSKI E.M., **Plant Drug analysis**; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York Tokyo, 1984.

WEIDENHAMER, J.D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 866-875, Nov./Dec., 1996.

WEIDENHAMER, J. D, ROMEO. J. T. Allelochemicals of polygonella myriophylla: chemistry and soil degradation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 5, 2004.

WESTON, L. A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 860-866, 1996.

agroeco.inpa.gov.br/reinaldo/RIBarbosa_ProdCient_Usu_Visitantes/2003FenologiaSavana_54CNB.pdf – acesso em 22/07/2009 às 14:35

www.rededesementesdocerrado.com.br - LORENZI, H, 1998.; FERRI, M.G, 1969.; SILVA, S. R *et al*, 2001 - acesso em: 22/07/2009 às 15:05.

APÊNDICE

I) Reagentes para Identificação dos metabólitos secundários:

- **Reagente de Mayer** (teste para alcalóides):

Misturaram-se 1,36g de HgCl₂ em 60 mL de água e 5 g de KI em 10 mL de água destilada. Diluiu-se para 100 mL.

- **Reagente de Wagner** (teste para alcalóides):

Dissolveram-se 1,27 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 5 mL de água destilada e completou-se o volume para 100 mL com água.

- **Reagente de Dragendorff** (teste para alcalóides):

Solução A: dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto(III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água destilada.

Solução B: dissolveu-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água.

Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

- **Reagente de Baljet** (teste para glucosídeos cardiotônicos):

Solução A: 1 g de ácido pícrico em 100 mL de etanol.

Solução B: 10 g de NaOH em 100 mL de água destilada.

Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

- **Reagente de Kedde** (teste para cardenólidos):

Solução A: Ácido 3,5- dinitrobenzóico a 3% em metanol.

Solução B: KOH a 5,7% em água destilada.

Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

- **Reagente de Raymond-Marthoud** (lactônicos dos cardenólidos):

Dissolveu-se 1 g de m-dinitrobenzeno em etanol, completando-se o volume a 100 mL.

- **Reagente de Liebermann-Burchard** (teste para glucosídeos cardiotônicos):

Misturaram-se 10 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

- **Reagente de Salkowski** (esteróides):

Ácido sulfúrico concentrado.

- **Reagente citrobórico:**

Dissolveram-se 5 g de ácido bórico e 5 g de ácido cítrico em etanol e completou-se o volume da solução a 100 mL.

- **Solução de cloreto férrico:**

Preparou-se uma solução 10% de cloreto férrico em água destilada.

- **Gelatina:**

Preparou-se uma solução 1% de gelatina Merck em água destilada.

- **Gelatina-sal:**

Dissolveram-se 1 g de gelatina Merck e 10 g de cloreto de sódio em água destilada completando-se o volume da solução a 100 mL.

- **Solução salina:**

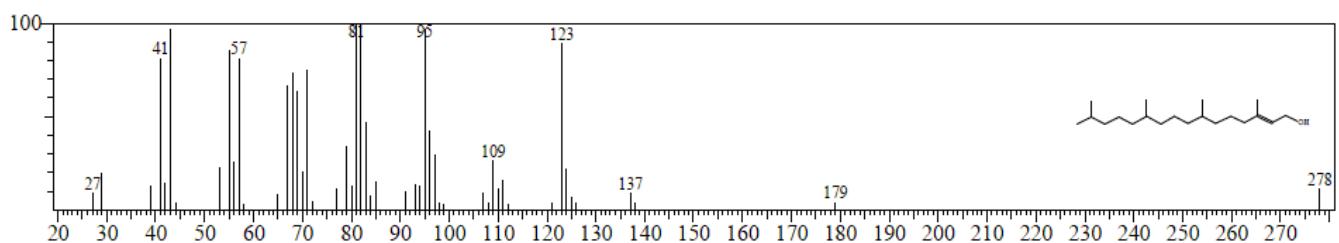
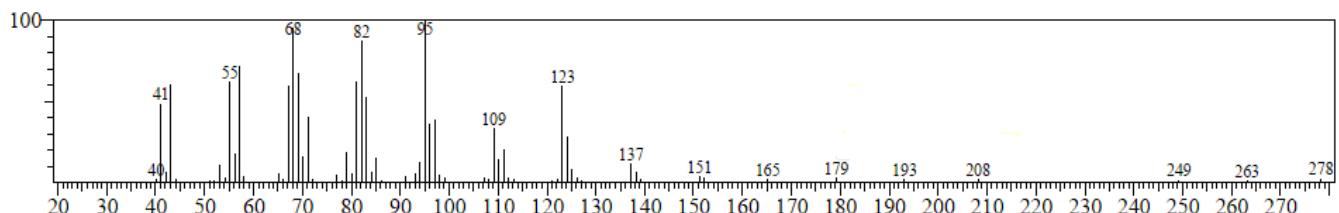
Dissolveu-se 10% de cloreto de sódio em água destilada.

- **Reagente de Bornträger** (teste para antraquinonas):

Preparou-se uma solução de NaOH a 5% em água destilada.

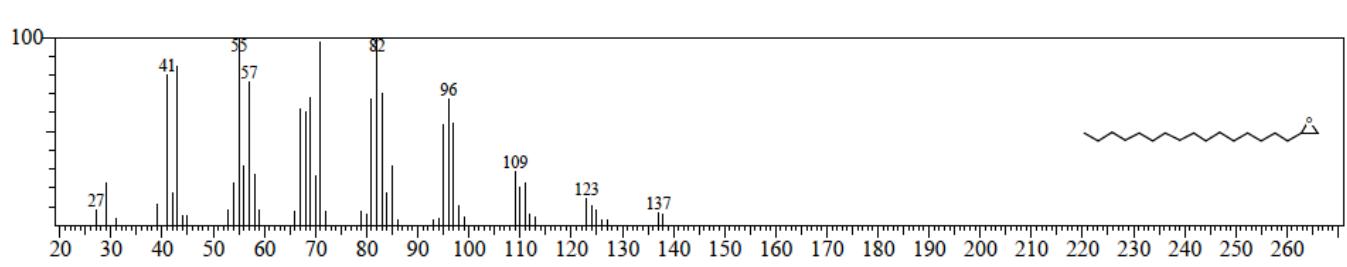
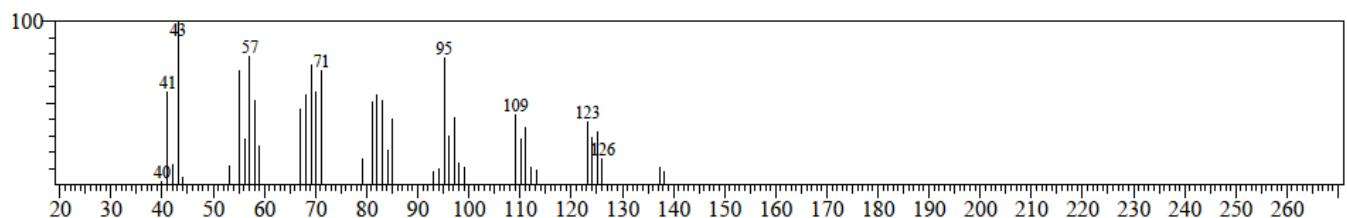
II) Espectros e suas respectivas estruturas:

1) T.R: 41.467 S.I:92



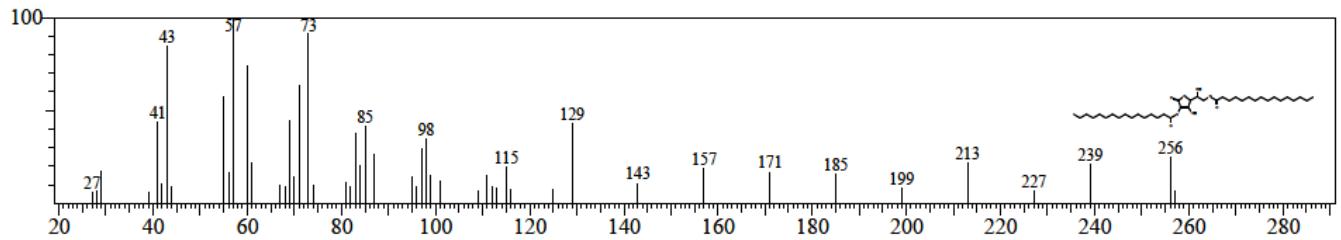
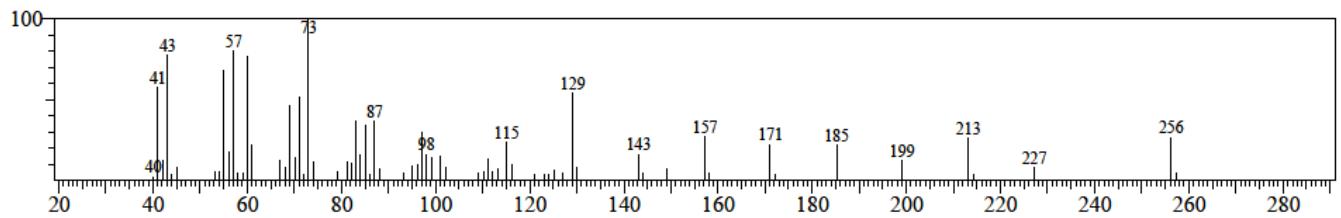
Fórmula: C₂₀H₄₀O
Nome: 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol

2) T.R: 40.842 S.I: 89



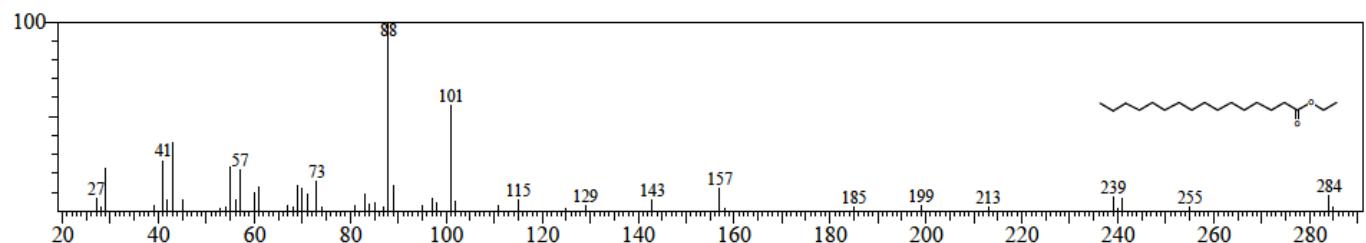
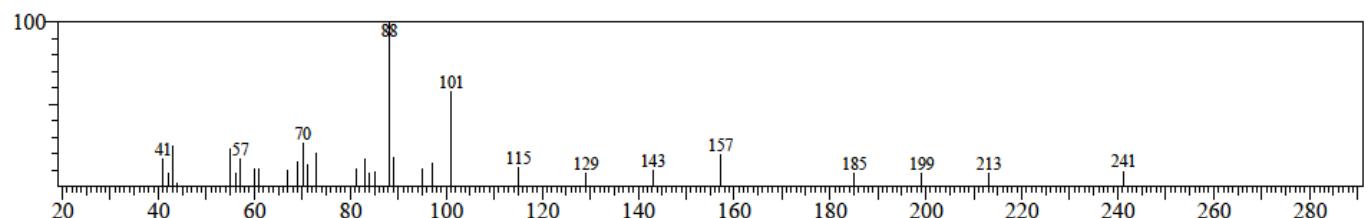
Fórmula: C₁₈H₃₆O
Nome: 2-Hexadeciloxirano

3) T.R: 42.201 S.I: 90



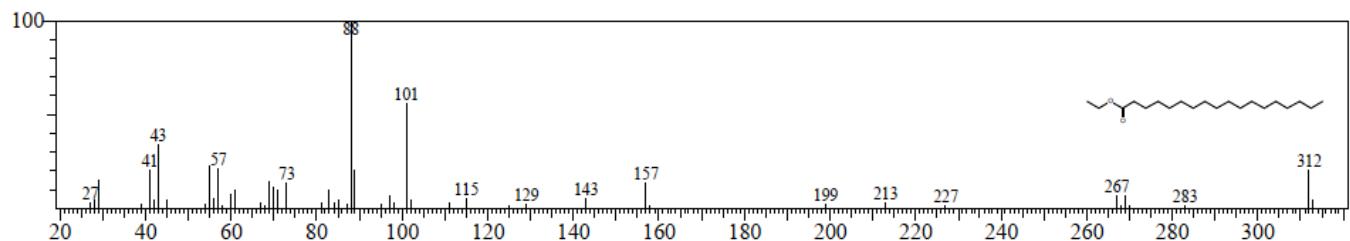
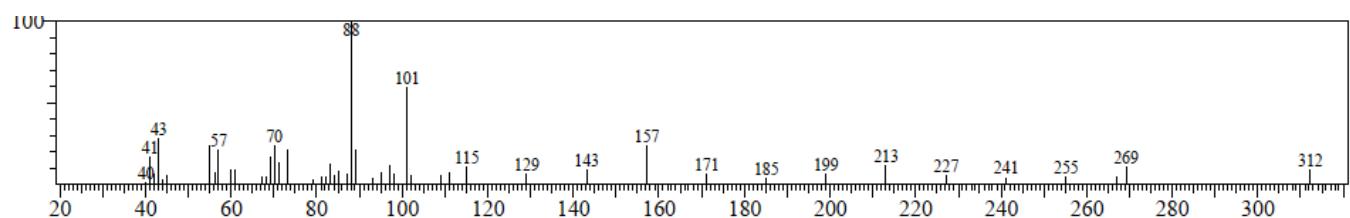
Fórmula: C₃₈H₆₈O₈
Nome: 1-(+)-ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato

4)T.R:44.862S.I:88



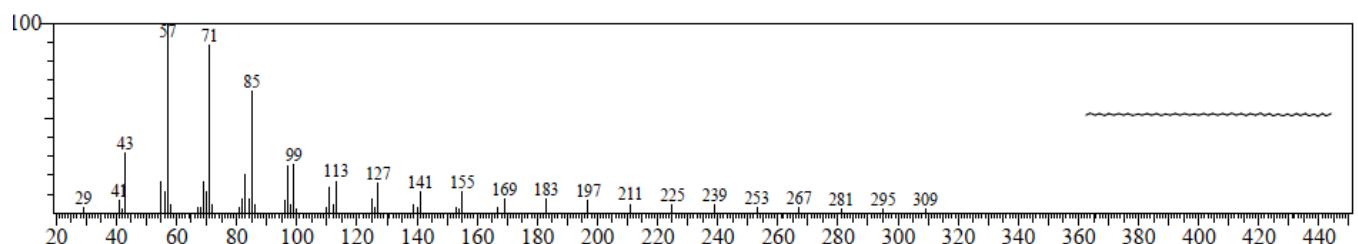
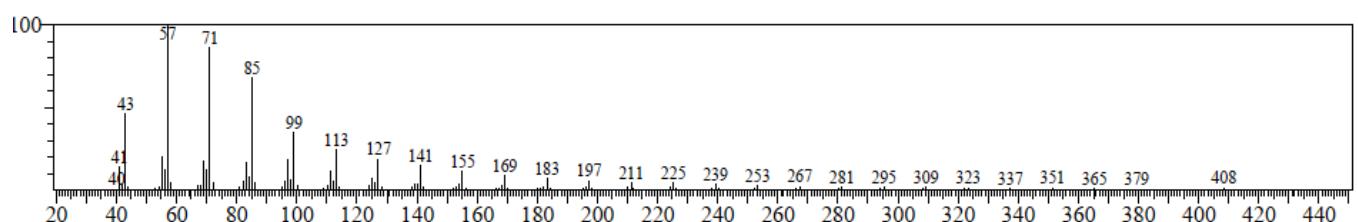
Fórmula: C₁₈H₃₆O₂
Nome: Etil-hexadecanoato

5)T.R:49.305S.I:91



Fórmula: C₂₀H₄₀O₂
Nome: Etil octadecanoato

6)T.R:57.990S.I:93



Fórmula: C₅₄H₁₁₀

Nome: Tetrapentacontano