



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Pós - Graduação em Química

MON
54
A553/p
TES/MEM

**PROPRIEDADES HERBICIDAS DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE
CAULE E RAIZ DE *Caryocar brasiliense* (PEQUI).**

ORIENTADOR: Dr. MANUEL GONZALO HERNANDEZ -TERRONES

Professor do Instituto de Química - UFU

ALUNA: GLÁUCIA APARECIDA ANDRADE

MATRICULA: 5032401-0

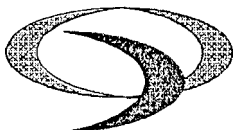
UBERLÂNDIA - MG

2005

SISBI/UFU



1000223258



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

ALUNO(A): GLÁUCIA APARECIDA ANDRADE

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5032401-0

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Propriedades herbicidas de metabólitos secundários presentes nos extratos de caule e raiz de *Caryocar brasiliense* (Pequi)”

ORIENTADOR: PROF. DR. MANUEL GONZALO HERNANDEZ
TERRONES

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco E do Campus Santa Mônica no dia 08 de setembro de 2005 às 13 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Manuel G. Hernandez Terrones

(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Sérgio A. Lemos de Moraes

(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Hércules da Silva Miglio

(UFMS)

Uberlândia, 08 de setembro de 2005.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, da inteligência, pela força que me deste, transformando um grande obstáculo em pequeno, para que eu pudesse transpô-lo facilmente.

Aos meus pais, Moacir e Maria de Lourdes, e aos meus irmãos, Gleisson e Glauciana, pelo carinho, compreensão e motivação a mim dedicados.

Ao meu noivo Douglas, por compreender a distância, a ausência e, acima de tudo, pelo apoio e orientação para com meu trabalho.

Aos amigos, pelos sorrisos nas horas difíceis, pelas risadas nos momentos de alegria, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

Ao meu orientador prof. Dr. Manuel, pela orientação, confiança, apoio e a liberdade de trabalhar que deu a mim.

Aos professores, por compartilhar seus conhecimentos e pela orientação profissional.

Aos professores Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, Dr. Evandro Afonso do Nascimento e Ms. Roberto Chang, pelas análises realizadas.

Ao professor Dr. Domingos Sávio de Miranda, pela participação na banca de qualificação e aos professores Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Hércules da Silva Miglio, pela participação na banca de defesa.

Aos profissionais do LASEM (Laboratório de Sementes), pela disposição com a qual me ajudaram.

À FASF-Luz (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras do Alto São Francisco) por disponibilizar suas dependências e aos professores desta, pelas ajudas e pelos incentivos.

Aos funcionários, técnicos de laboratório, da análise e as secretárias, pela força, apoio e principalmente, pela “quebra de galhos”.

À CAPES pelo incentivo financeiro, através da bolsa a mim disponibilizada.

Quantas Vezes

Autor Desconhecido

“Quantas vezes nós pensamos em desistir, deixar de lado o ideal e os sonhos;

Quantas vezes batemos em retirada, com o coração amargurado pela injustiça;

Quantas vezes sentimos o peso da responsabilidade, sem ter que com quem dividir;

Quantas vezes sentimos solidão, mesmo estando cercado de pessoas;

Quantas vezes falamos sem sermos notados;

Quantas vezes lutamos por uma causa perdida;

Quantas vezes voltamos para casa com a sensação de derrota;

Quantas vezes aquela lágrima, teima em cair, justamente na hora em que precisamos parecer fortes;

Quantas vezes pedimos a Deus um pouco de força, um pouco de luz; E a resposta vem, seja lá como for, um sorriso, um olhar cúmplice, um cartãozinho, um bilhete, um gesto de amor;

E a gente insiste, insiste em prosseguir, em acreditar, em transformar, em dividir, em estar, em ser;

E Deus insiste em nos abençoar, em nos mostrar o caminho:

Aquele mais difícil,

Mais complicado, mais bonito.

E a gente insiste em seguir,

Porque tem uma missão:

SER FELIZ!

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	01
1.1-Plantas Daninhas	01
1.1.1-Controle das Plantas Daninhas	01
1.2-Herbicidas	02
1.2.1-Modo e Mecanismo de Ação dos Herbicidas	06
1.2.2-Descoberta de Novos Herbicidas	07
1.3-Alelopatia	10
1.3.1-Natureza das Substâncias Alelopáticas	13
1.3.1.1- Alcalóides	16
1.3.1.1.1- Alcalóides Tropânicos	18
1.3.1.1.2- Alcalóides Indólicos	19
1.3.1.1.3- Alcalóides esteroidais	20
1.3.1.2- Óleos Voláteis	20
1.3.1.3- Flavonóides	21
1.3.1.4- Taninos	26
1.3.1.5- Quinonas	28
1.3.1.6- Heterosídeos cardioativos	29
1.3.1.7- Saponinas	30
1.3.1.8- Cumarinas, Cromonas e Xantonas	31
1.3.2- Análise Fitoquímica	32
1.3.3-Função nos Organismos	33
1.3.4-Liberação no Meio Ambiente	34
1.3.5-Mecanismo de ação	35
1.3.6-Duração da Atividade Alelopática	35
1.4- <i>Caryocar brasiliense</i>.....	36
2- OBJETIVOS	40
3- PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1 - Obtenção Dos Extratos Brutos	41
3.2 – Germinação	41
3.2.1 – Esterilização das caixas de germinação	42
3.3 – Coleta de dados	42

3.4 – Preparação da coluna seca	42
3.5 – Obtenção das Frações	43
3.6 – Germinação	43
3.7 – Preparação da coluna úmida	43
3.8 – Obtenção das subfrações	44
3.9 – Identificação de Metabólitos Secundários	44
3.10 – Cromatografia gasosa Acoplada à espectrometria de massas.....	45
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5 - CONCLUSÃO	63
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7 – APÊNDICE	73

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Abrangência e efeito de compostos vegetais bioativos	15
TABELA 2: Tipos de alcalóides, aminoácidos precursores e exemplos das classes.....	17
TABELA 3: Massas e percentagens dos extratos brutos de caule e raiz de pequi.....	46
TABELA 4: Composição química da madeira.....	46
TABELA 5: Massas e percentagens das frações do extrato de caule de pequi.	50
TABELA 6: Massas e percentagens das frações do extrato de raiz de pequi....	53
TABELA 7: Subfrações da fração 7:3 acetato de etila/ metanol.....	55
TABELA 8: Resultados dos testes de reconhecimento das classes de metabólitos secundários nas frações e subfrações ativas.....	58
TABELA 9: Estruturas identificadas na fração hexânica, por CGEM.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estruturas dos herbicidas utilizados por O'Sullivan e Bouw (1993).....	04
FIGURA 2: Estruturas de herbicidas comerciais.....	05
FIGURA 3: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	16
FIGURA 4: A dendrobina (1) é um exemplo de protoalcalóides, enquanto que a ciclomicrofilina (2) representa um alcalóide.....	18
FIGURA 5: A Atropina representa classe dos alcalóides tropânicos. É retirada da <i>Atropa belladonna</i> L.....	19
FIGURA 6: Exemplos de alcalóides indólicos, que apresentam atividades farmacológicas: (1) - ajmalicina, (2) – ioimbima.....	19
FIGURA 7: Estrutura da solasodina.....	20
FIGURA 8: Ácido <i>trans</i> -cinâmico, um fenilpropanóide.....	21
FIGURA 9: Estrutura da 1,2-epóxi-pulegona.....	21
FIGURA 10: Esqueleto básico dos flavonóides (1) e a estrutura da tumbulina (2).....	22
FIGURA 11: Exemplos de estruturas de flavonas, flavonóis e flavonóide O-heterosídeo: luteolina (1), canferol (2), quercetina-3-O-glucosídeo (3).....	22
FIGURA 12: Estrutura da swertisina.....	23
FIGURA 13: Estrutura representativa da malvidina.....	23
FIGURA 14: Estrutura da culculcanina B.....	24
FIGURA 15: Esqueleto básico das auronas.....	24
FIGURA 16: Estruturas básicas de diidroflavonóis (1) e diidrochalconas (2)...	25
FIGURA 17: Estruturas: pterocarpano (1), isoflavonona (2) e isoflavana (3)...	25
FIGURA 18: 4-arilcumarinas (1) e as dalbergionas (2).....	26
FIGURA 19: Estrutura da amentoflavona.....	26
FIGURA 20: Estrutura geral de um tanino condensado, onde n varia de 1 a 10	27
FIGURA 21: Tanino hidrolisável de <i>Rhus semialata</i>	28
FIGURA 22: Estrutura da benzoquinona primina.....	29
FIGURA 23: Exemplo de estrutura de heterosídeo cardioativo, a digoxina.....	30
FIGURA 24: Estrutura da hederagenina.....	31
FIGURA 25: Estrutura da escoparona (1), quelina (2) e 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona (3)	31

FIGURA 26: <i>Caryocar brasiliense</i>	37
FIGURA 27: Efeitos da concentração do extrato metanólico de caule de <i>C. brasiliense</i> no desenvolvimento de sementes de <i>P. maximum</i>	47
FIGURA 28: Comparação de plantas na presença do extrato de caule de pequi.....	48
FIGURA 29: Efeitos da concentração do extrato metanólico da raiz de <i>C. brasiliense</i> no desenvolvimento de sementes de <i>P. maximum</i>	48
FIGURA 30: Comparação de plantas na presença do extrato de raiz de pequi..	49
FIGURA 31: Resultado da comparação de plantas do branco, na presença do extrato de caule e raiz a 200 ppm.....	50
FIGURA 32: Efeitos das frações do extrato de caule de <i>C. brasiliense</i> no desenvolvimento de sementes de <i>P. maximum</i>	51
FIGURA 33: Comparação de plantas na presença das frações do extrato de caule de pequi.....	52
FIGURA 34: Efeitos das frações do extrato de raiz de <i>C. brasiliense</i> no desenvolvimento de sementes de <i>P. maximum</i>	53
FIGURA 35: Comparação de plantas na presença das frações do extrato de raiz de pequi.....	54
FIGURA 36: Efeitos das subfrações do extrato de raiz de <i>C. brasiliense</i> no desenvolvimento de sementes de <i>P. maximum</i>	56
FIGURA 37: Comparação de plantas na presença das subfrações extraídas da fração acetato/metanol (7:3) do extrato de caule de pequi.....	57
FIGURA 38: Cromatograma da fração de hexano.....	60

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, elongação 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. O resultado da análise da fração hexânica em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas constatou a presença de 21 compostos. Os compostos hexadecanoato de metila, (E)-10-octanoato de metila e 14-metilpentadecanoato de metila foram os abundantes, com valores de 40,40%; 24,89% e 13,52%, respectivamente. 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.

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 analysis in a gas chromatography with a mass spectrometer presented as results simples structures of acids, esters and alkanes. The compounds metyl-9-oxoexadecanoate, metyl-(E)-10-octadecenoate and metyl-14-methylpentadecanoate, which were presented in most quantities, in value, 40,40%; 24,89% and 13,52 %, respectively. The herbicide activity of root and stem extracts, their fractions and subfractions were associated of synergy phenomenon among the compounds were there.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Plantas Daninhas

Planta daninha é qualquer vegetal que cresce onde não é desejado juntamente com as culturas, interferindo no desenvolvimento, reduzindo a produção, competindo pela extração de água, luz, CO₂ e nutrientes, além de exercer inibição química sobre o desenvolvimento das plantas da cultura. As plantas daninhas podem ainda comprometer indiretamente certas culturas agrícolas por hospedarem pragas e doenças antes de infestarem as próprias culturas. Estima-se que as perdas na produção agrícola sejam em torno de 20 a 30% (LORENZI, 1990).

Uma das causas que tornam as plantas daninhas difíceis de serem extirpadas reside nas sementes, pois estas possuem capacidade especial para a luta pela resistência. Conseguem sobreviver em ambientes com poucas condições de vida, além de possuírem compostos que previnem a decomposição e que interferem na dormência das mesmas (SAAD, 1985).

As plantas daninhas possuem como característica comum grande agressividade, além de certos mecanismos que permitem a sobrevivência da espécie sob várias condições, tais como a grande capacidade de reprodução (se propagam por meio de sementes, rizomas, estolhos, bulbos e/ou novos rebentos), aliada a eficientes mecanismos de dispersão e grande longevidade de suas sementes. Sabe-se que uma única planta daninha pode produzir significativa quantidade de sementes e, via de regra, quanto menor o tamanho dessas sementes maior é o número produzido pela planta (GELMINI, 1988).

1.1.1-Controle das Plantas Daninhas

O controle de plantas daninhas consiste na adoção de certas práticas que resultam na redução da infestante. O nível do controle destas, obtido em uma lavoura, depende da espécie infestante, da cultura e dos métodos empregados (LORENZI, 1990).

Os três principais meios para diminuir as perdas são:

- **Prevenção:** consiste em evitar a contaminação de determinada região por ervas de uma certa espécie. É particularmente eficaz quando acompanhada de

sistemática rotação de culturas, a qual produz gradual mudança na população de ervas;

- **Erradicação:** este termo define certas práticas agrícolas necessárias para destruir ou remover completamente todas as ervas, incluindo as partes regenerativas das plantas, sendo que em alguns casos, torna-se necessário sacrificar parte da lavoura.

- **Controle:** é a forma mais sensata de resolver proveitosamente o problema da vegetação indesejável, onde toda a infestação pode ser diminuída a tal ponto que permita desenvolver uma cultura rica, apesar das ervas (SAAD, 1985).

O controle das ervas daninhas pode ser:

- **Mecânico:** é feito por meio de práticas agrícolas como o cultivo, a ceifa ou o corte, as queimadas e a escarificação.

- **De cultivo:** aproveita-se a rotação de cultura para modificar o ambiente e diminuir as ervas. Frequentemente a nova cultura compete com êxito com as ervas daninhas da lavoura anterior.

- **Biológico:** é um método em que se utiliza organismo vivo, em sua maioria insetos, para controlar as ervas.

- **Químico:** é a utilização de produtos químicos, herbicidas. Este processo oferece maior potencialidade e teve grande desenvolvimento em anos recentes.

Qualquer dos métodos para o controle e a erradicação das ervas é insuficiente por si só, sendo necessários todos esses processos unidos em um programa geral e em longo prazo (SAAD, 1985).

1.2-Herbicidas

Um herbicida pode ser definido como qualquer produto químico que mata ou inibe grandemente o desenvolvimento de uma planta (LORENZI, 1990). É frequentemente empregado para matar ervas daninhas sem causar prejuízo à vegetação desejável, mas também é utilizado para eliminar plantas indesejáveis das margens das estradas e ferrovias e para marcar corretamente as linhas das trilhas, e às vezes, para desfolhar regiões inteiras. 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).

Desde o final dos anos 60, os herbicidas são amplamente usados na América do Norte, com vendas que excedem atualmente os US\$ 4 bilhões por ano (BAIRD, 2002). Existem no Brasil aproximadamente cinquenta princípios ativos herbicidas efetivamente em uso, os quais compõem quase uma centena de formulações (LORENZI, 1990).

Nos tempos bíblicos, os exércitos usavam sal ou uma mistura de salmoura e cinzas para esterilizar alguns territórios que tinham conquistado, na tentativa de torná-los inabitáveis para as gerações futuras do inimigo. Na primeira metade do século 20, foram usados vários compostos inorgânicos para eliminar ervas daninhas – principalmente arsenito de sódio (Na_3AsO_3), clorato de sódio (NaClO_3), e sulfato de cobre (CuSO_4). Os dois últimos são exemplos de um grande número de sais anteriormente usados como pulverizadores herbicidas que matam plantas mediante a primitiva ação de extrair a água e desidratar as plantas, deixando ainda a terra agricultável.

Os derivados orgânicos do arsênio substituíram seus compostos inorgânicos como herbicidas, já que são menos tóxicos para os mamíferos. Em geral, os herbicidas inorgânicos e organometálicos foram em grande parte gradualmente eliminados devido a sua persistência nos solos, sendo o mercado atualmente dominado pelos herbicidas totalmente orgânicos. Sua utilidade está parcialmente baseada no fato de serem muito mais tóxicos para certas plantas do que para outras, de maneira que podem ser utilizados para erradicar as primeiras, sem deixar prejudicadas as últimas (BAIRD, 2002).

O indiscriminado uso de herbicidas sintéticos tem provocado um aumento na resistência de plantas daninhas para alguns herbicidas, além da poluição ambiental causada pelos resíduos de cada aplicação feita e os potenciais danos à saúde, devido aos compostos altamente tóxicos para o homem, que são utilizados na fabricação dos herbicidas (MACIAS *et al.*, 1999). Em um enfoque agrícola, a redução dos problemas ambientais e os custos de proteção às culturas aparecem como parâmetros prioritários, na melhoria da qualidade de alimentos. Neste contexto, surge 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).

Por outro lado, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de reduzir este uso indiscriminado e bons resultados têm sido encontrados. O'Sullivan e Bouw (1993) pesquisaram a eficácia de herbicidas pós-emergentes (aplicados após a germinação) com proporções reduzidas de aplicação no controle de plantas daninhas de folhas largas em plantações de milho, durante um período de três anos. Foram aplicadas as misturas de metolacloril/ciazina (3:1 m/m, concentração recomendada de 3.8 Kg/ha), ciazina/atrazina (3:1 m/m, concentração recomendada de 3.0 Kg/ha) e metolacloril/atrazina (3:2 m/m, concentração recomendada de 3.0 Kg/ha), nas proporções de 100%, 50% e 25% da concentração recomendada. As plantas daninhas foram consideravelmente reduzidas nas aplicações de 25% da concentração recomendada em todas as misturas testadas. A adição de um adjuvante melhorou o controle das gramíneas. Uma última aplicação de nicosulfurona/rimsulfurona (1:1 m/m, concentração recomendada de 25 g/ha) aumentou significativamente o controle das gramíneas, comparado à aplicação da mistura cianazina/atrazina aplicada sozinha. Os resultados indicam que uma aplicação reduzida de herbicidas pós-emergentes pode ser usada no controle de plantas daninhas em milho se os herbicidas forem usados antecipadamente.

A Figura 1 apresenta as estruturas da ciazina, metolacloril, atrazina, nicosulfurona e rimsulfurona.

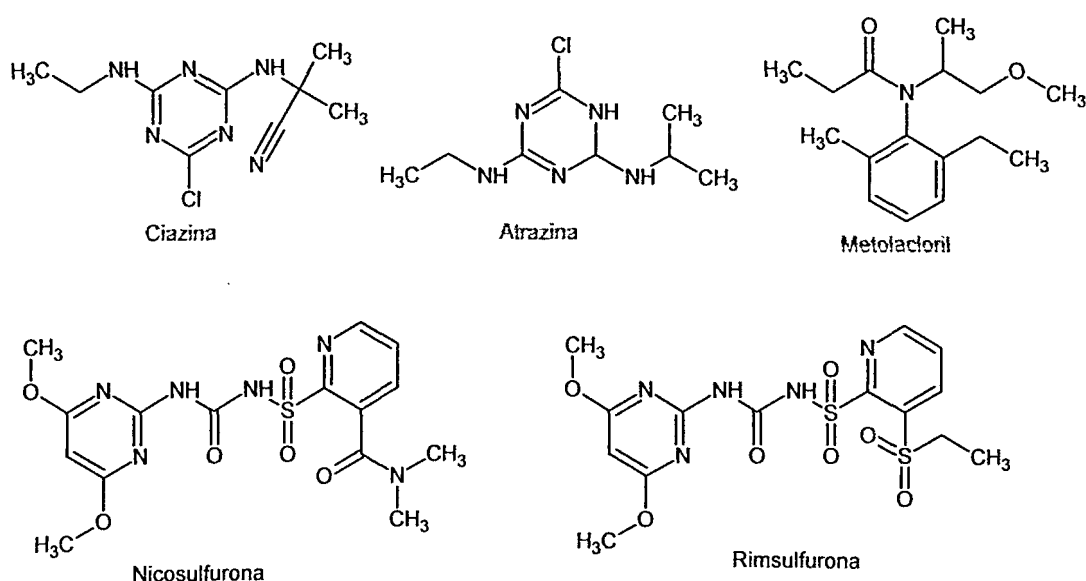


FIGURA 1: Estruturas dos herbicidas utilizados por O'Sullivan e Bouw (1993).

Nas últimas duas décadas, os herbicidas tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são:

- **Paraquat:** comercializado com o nome de Gramoxone.
- **Glifosato:** round up.
- **Pentaclorofenol.**
- **Derivados do ácido fenoxiacético:** 2,4 diclorofenoxiacético (comercializado com nome de 2,4 D) e 2,4,5 triclorofenoxiacético (com nome comercial de 2,4,5 T). A mistura de 2,4 D com 2,4,5T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como desfolhante na Guerra do Vietnã. O nome comercial dessa mistura é **Tordon**.
- **Dinitrofenóis:** Dinoseb, DNOC. (MACÊDO, 2002).

As estruturas dos herbicidas citados anteriormente estão apresentadas na Figura 2.

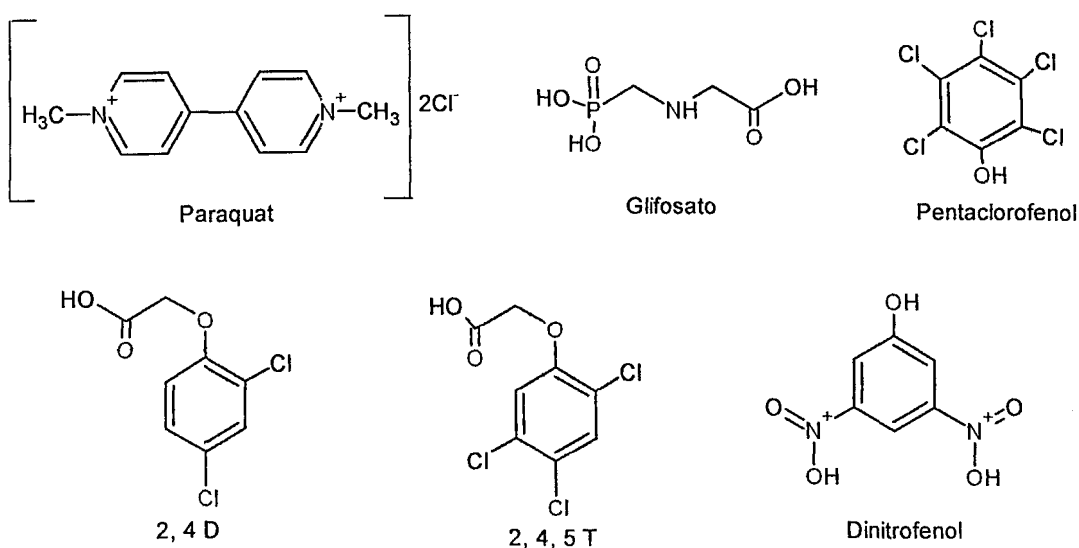


FIGURA 2: Estruturas de herbicidas comerciais.

Para que um herbicida atue e seja eficaz, deve primeiro cumprir certos requisitos:

- Entrar em contato com a planta que se deseja controlar;
- Ser absorvido pela planta daninha;
- Deslocar-se para o sítio de ação dentro da planta, sem ser desativado;
- Acumular-se a níveis suficientemente tóxicos nos sítios de ação.

1.2.1-Modo e Mecanismo de Ação dos Herbicidas

Para evitar seu uso inapropriado e otimizar sua utilização, é indispensável conhecer e entender como os herbicidas atuam, seu modo e mecanismo de ação.

O modo de ação pode ser definido como sendo a seqüência completa de eventos que ocorrem desde a aplicação do herbicida até a morte da planta. Os herbicidas que apresentam o mesmo mecanismo de ação produzirão os mesmos sintomas nas plantas, assim como seletividade aos cultivos e às plantas daninhas.

O mecanismo de ação de herbicida se refere ao sítio bioquímico no qual o herbicida atua, podendo ter apenas um sítio de ação muito sensível, cujo efeito pode ser suficientemente severo para causar a morte das plantas mais sensíveis, ou/e sofrem processos metabólicos não específicos, onde diferentes sítios podem ser afetados. Assim, à medida que sua concentração aumenta dentro da planta, sítios adicionais, menos sensíveis, podem ser afetados e a somatória destes efeitos em diferentes sítios leva as plantas à morte (KOGAN e PÉREZ, 2003).

Para a exata localização dos sítios de ação requer conhecer a colocação do herbicida na planta, os sintomas provocados por este, as vias metabólicas envolvidas no processo da inibição e a concentração necessária para que o herbicida leve a planta à morte. Os estudos da correlação das reações ou os passos metabólicos, *in vivo* ou *in vitro*, podem ser provas que indiquem a provável localização do sítio de ação.

De acordo com os conhecimentos atuais, os herbicidas podem ser classificados, segundo seu mecanismo de ação, em grupos diferentes (KOGAN e PÉREZ, 2003):

- **Reguladores de crescimento:** regulam o crescimento celular, a síntese de proteínas e a divisão celular das plantas. Podem inibir ou estimular o crescimento, dependendo de sua concentração.
- **Inibidores de biossíntese de lipídeos:** controlam, principalmente as ervas daninhas gramíneas, pois apresentam seu mecanismo de ação primário relacionado com a síntese dos lipídeos.
- **Inibidores de biossíntese de aminoácidos:** no núcleo dos cloroplastos encontram-se as enzimas responsáveis pela biossíntese dos aminoácidos, utilizando esqueletos de carbono da fotossíntese. Os herbicidas impedem a formação dos intermediários da glicólise e do Ciclo de Krebs.

- **Inibidores da fotossíntese:** os herbicidas se acoplam com a proteína D₁, competindo com a quinona Q_B, impedindo que esta se acople. Esta inibição é reversível e competitiva, o que provoca o deslocamento de Q_B e o bloqueio do fluxo de elétrons, reduzindo a fixação de CO₂ e a síntese de carboidratos.

- **Desestabilizadores de membranas celulares:** atuam como disruptores de membranas. Caracterizam-se por ser de ação foliar (é de contato). São de ação rápida, provocando a morte da planta tratada pouco depois de sua aplicação.

- **Inibidores da biossíntese de pigmentos:** bloqueiam a síntese de carotenóides (pigmentos receptores de luz) na planta, o que provoca a formação de radicais livres, que iniciam a peroxidação dos lipídeos, necrosando a folha, matando a planta. Caracterizam-se também como disruptores de membranas celulares. São aplicados na planta e ativados pela luz, formando compostos muito reativos que provocam a ruptura das membranas, causando o derrame dos fluidos da célula, e conseqüentemente a destruição do tecido.

- **Disruptores mitóticos (venenos mitóticos):** bloqueiam a divisão celular, inibindo a formação de raízes laterais ou a elongação dos brotos, mas não impedem a germinação das sementes.

Inibidores da biossíntese da celulose: inibem, direta ou indiretamente, a biossíntese da celulose, o que conduz à falta de integridade da estrutura celular. (KOGAN e PÉREZ, 2003).

A inibição do fluxo de elétrons fotossintéticos, e o sistema de transporte de prótons têm sido o principal controle de ação de 50% dos herbicidas comerciais (BOWER *et al.*, 1987; LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2001a; LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2001b; HERNANDEZ-TERRONES *et al.*, 2003a; HERNANDEZ-TERRONES *et al.*, 2003b; KING-DIAZ *et al.*, 2002).

1.2.2-Descoberta de Novos Herbicidas

Os herbicidas sintéticos têm uma grande variedade estrutural, com diferentes mecanismos de ação, atuando em sítios metabólicos específicos nas plantas. Cada vez é mais difícil descobrir novas estruturas que sirvam de modelo para a síntese de herbicidas comerciais, e que são benignos para outras formas de vida (WRIGHT, PILLMOR e BRIGGS, 1991; KING-DIAZ *et al.*, 2001).

Novos métodos de ação herbicidas são muito procurados pelas indústrias, porque estes métodos oferecem ferramentas adicionais para combater a evolução da resistência aos herbicidas atualmente disponíveis e alternativas para os que já tem resistências evoluídas. Uma saída é explorar os mecanismos de ação de fitotoxinas naturais. Compostos de ocorrência natural oferecem precedentes para novas classes herbicidas químicas, sendo úteis na identificação de novos sítios de ação para herbicidas. Há muito pouco espaço entre um sítio alvo molecular de fitotoxinas naturais e aqueles de herbicidas sintéticos comerciais ou quase sendo comercializados (DUKE *et al.*, 1997a).

As estratégias modernas para o descobrimento de novos agroquímicos estão enfocadas nos produtos naturais, porque oferecem um impacto reduzido sobre o meio ambiente e possuem especificidade (McCARTY, TREBS e AVRON, 1975; GOOD, TREBS e AVRON, 1975). Neste contexto, 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.

Como os produtos naturais obtidos de matéria-prima vegetal oferecem uma larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica, que podem se manifestar através das suas propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ou farmacológicas (DUKE, DAYAN e RIMANDO, 1998; DUKE e LYNDON, 1993; SIMÕES *et al.*, 2000a; ISHAAYA, 2000), os herbicidas são mais eficientes e de atividade específica. Para isto pode ser seguida uma das seguintes estratégias:

1. Síntese de herbicidas bioquimicamente direcionados.
2. Síntese de novos compostos com triagem biológica apropriada.
3. Produtos naturais como uma fonte de novos tipos estruturais de compostos (MACIAS *et al.*, 1999).

É conveniente comentar que se o extrato bruto possui o efeito biocida, poderia parecer contraditório o fato de ter que se isolar o princípio ativo que contem, e mais ainda que a aplicação prática deste último seja em porcentagem maiores, porém isso não é justificado considerando que:

- O uso do extrato bruto pode ter em alguns casos menor efeito que o uso do princípio ativo isolado (substância pura);

- Deve-se conhecer a pureza e concentração do composto ativo a ser usado, (não possível utilizando o extrato bruto);
- A concentração do princípio ativo nas plantas é pequena (geralmente 0,1-2,0% na planta, em outros casos menor que 0,01%).

Por outro lado, o isolamento e conhecimento estrutural de compostos de plantas propiciam reações para produzir derivados semissintéticos, tornando importante isolar os princípios ativos das plantas, e o localizar nas diferentes partes das plantas ou nos diferentes extratos, sendo motivo de ensaios biológicos adequados (FERREIRA, *et al.*, 2000; GEISSMAN e CROUT, 1969).

Assim, um composto natural pode ajudar a projetar um eficiente herbicida. Mas inibir um processo bioquímico não é suficiente por si só. O composto terá que ser eficientemente transportado do lugar de aplicação para o lugar de ação, sobrevivendo ao sistema metabólico que poderá inativá-lo por degradação.

Todos os compostos são avaliados em testes *in vivo*, nos quais são testados em atividades pré-emergentes (aplicação no solo) e em atividades pós-emergentes (aplicação na folhagem). Observa-se o desenvolvimento dos sintomas exibidos pelos testes, o que indica o possível meio de ação do composto testado. Mas é difícil de tirar uma conclusão, uma vez que plantas emergem após o tratamento pré-emergente e pode levar vários dias para desenvolver sintomas após o tratamento pós-emergente.

Tendo sido detectado ação herbicida, o próximo passo é estudar o modo de ação deste composto na planta. Para isso, é necessário focar-se em um processo bioquímico que é conhecido, ou pode ser previsto, ser a causa dos sintomas observados.

Assim que este processo foi estabelecido como alvo principal do composto, a enzima deste processo deve ser identificada. Deste modo, indícios podem ser obtidos das análises das mudanças dos tamanhos dos reservatórios de vários intermediários do processo escolhido, seguindo aplicações do composto. Em um extremo, pode ser a questão da extração e teste seqüencial de cada uma das enzimas individualmente.

A informação sobre o tipo de inibição: se for tempo-dependente, um processo reversível ou irreversível, pode ajudar no entendimento do mecanismo pelo qual o composto age, podendo, então, maximizar esta atividade bioquímica.

Este processo de maximização da atividade inibitória consiste em encontrar um composto químico que iniba o máximo possível. Mas nem sempre o melhor composto ativo quimicamente é o melhor biologicamente. Uma parte importante deste é estabelecer o que é e o que não é permitido dentro da construção do sítio, de modo que o químico possa subseqüentemente fazer mudanças para modificar o superaproveitamento, transporte, estabilidade metabólica e as propriedades seletivas do composto de uma maneira que não comprometa os requerimentos da atividade bioquímica aceitável (WRIGHT, PILLMOR e BRIGGS, 1991).

As propriedades físico-químicas de herbicidas, tal como a solubilidade, coeficiente de partição e volatilidade, também são de relevância crucial na atividade *in vivo*, uma vez que controlam a transferência dos aleloquímicos para a planta e o aproveitamento e redistribuição dentro da mesma, e assim, construindo a rede de acumulação no sítio alvo. Estas propriedades físicas podem ser medidas ou calculadas de uma estrutura química, determinando sua influência potencial na atividade *in vivo*.

O principal mecanismo de seletividade do herbicida é o metabolismo da planta, pois depende do aproveitamento dos compostos químicos do herbicida, do transporte deles dentro do xilema e do floema até sua chegada ao sítio de interesse dentro da planta. Deste modo, plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas mostram sensibilidades diferenciadas em relação ao composto inibidor.

Como o banco de dados sobre o metabolismo das plantas está aumentando devido a vários feitos nesta linha de pesquisa, é possível designar seletividades aos candidatos herbicidas, o que não era possível, pois o conhecimento era insuficiente para concluir isto (WRIGHT, PILLMOR e BRIGGS, 1991).

1.3-Alelopatia

Os habitats dos seres vivos são dinâmicos, nos quais a constituição é definida por fatores físicos (temperatura, luz, etc.), químicos (oxigênio, água, compostos orgânicos e inorgânicos), e por algumas interações (competições por nutrientes), sendo que a maior parte destas são ainda pouco conhecidas (ALMEIDA, 1988).

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. A separação destes dois processos no campo experimental não é possível (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993; IKAN, 1991).

A capacidade das plantas produzirem estes compostos químicos e a natureza destas substâncias difere entre as espécies, assim como a suscetibilidade destas mesmas plantas às substâncias químicas liberadas por outras (ALMEIDA, 1988).

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 elaborado. 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. Existe uma literatura considerável sobre o comportamento alelopático entre vegetais (MIZUTANI, 1999; REIGOSA, PEDRO, 2002; ALIOTTA *et al.*, 1994; BAGHESTANI *et al.*, 1999).

As plantas têm o seu próprio mecanismo de defesa e os aleloquímicos são, de fato, herbicidas naturais. Os aleloquímicos isolados de plantas ou microorganismos são uma fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas. Estes herbicidas naturais podem ser mais específicos com novos modos de ação e de maior potencial que aqueles usados atualmente na agricultura. Desta forma, a alelopatia pode ajudar fornecendo novos conceitos de controle integrado de plantas daninhas, variedades de culturas e novas gerações de fitotoxinas. O uso de aleloquímicos como herbicidas, naturais ou modificados, é uma das técnicas, envolvendo alelopatia, que tem sido sugeridas para eliminar plantas daninhas (MACIAS *et al.*, 1999).

O potencial alelopático do extrato bruto da folha de *Tamarindus indica* L. foi investigado através de bioensaios com plantas daninhas e plantas comestíveis. O crescimento radicular e o hipocótilo de todas as plantas foram fortemente

inibidos. O trevo branco e a grama de celeiro das plantas daninhas e a alface e o rabanete do grupo comestível foram os mais afetados em relação ao controle, onde quanto maior foi a concentração do extrato, maior a inibição observada. Estes resultados indicam que a folha de tamarindo contém um ou mais aleloquímico com forte atividade reguladora do crescimento (PARVEZ *et al.*, 2003).

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).

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 e GONZÁLEZ, 1999).

Um ponto importante é que o efeito do aleloquímico depende do composto químico que é adicionado ao meio ambiente, separando, assim, o fenômeno de alelopatia do de competição, que envolve a remoção ou indução de algum fator da natureza que é requisitado por outras plantas que dividem o habitat. Estes aleloquímicos, que são nada mais que compostos orgânicos, inibem a uma certa concentração, mas também estimulam o mesmo processo ao qual atuam, quando em pequenas concentrações.

Outro aspecto da alelopatia é o efeito de sinergia. As ações de sinergismo resultam da combinação de atuações de dois ou mais compostos, ou seja, sua eficácia é maximizada quando estes compostos agem juntos. Se os separarmos, nenhuma atividade será observada (RICE, 1984).

O estudo sobre alelopatia pode ser complicado de ser realizado. Isto se deve ao fato de que 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 e WESTON, 1997b).

É interessante notar que os efeitos alelopáticos das culturas sobre as ervas daninhas são pouco comuns. Esta deficiência de defesa das plantas cultivadas é atribuída à seleção a que as mesmas têm sido submetidas ao longo do tempo por outras características que não as de agressividade para outras plantas. Os fatores considerados nesta seleção encontram-se o paladar e a toxicidade, o que foi eliminado os genótipos possuidores de substâncias alelopáticas que lhes conferem sabor desagradável (como os taninos) ou que são venenosas (como os alcalóides), mas que são fortes toxinas para as outras plantas (ALMEIDA, 1988).

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 observou uma redução significativa da germinação e do crescimento radicular, onde os extratos se mostraram mais ativos. Assim, concluiu que esta 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.

As plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas possuem resistências diferenciadas frente a um ataque alelopático. Andrade *et al.* (2004) testou extratos do caule e raiz de *Cenchrus echinatus* em sementes monocotiledôneas e dicotiledôneas, analisando a germinação, alongamento de da raiz e parte aérea. Verificou-se que o extrato, da raiz apresentou melhor potencial inibitório e que as plantas monocotiledôneas foram mais afetadas ao ataque alelopático.

1.3.1-Natureza das Substâncias Alelopáticas

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-HENNSSEN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1999).

Os cientistas dedicados ao estudo da alelopatia têm-se esforçado em isolar e identificar a estrutura química dos produtos secundários. Uma mesma planta produz diversos aleloquímicos e eles desencadeiam diversas interações, o que torna difícil estabelecer qual dos compostos foi responsável pelo sintoma observado, sendo que os sintomas são observados em conjunto e os compostos descobertos isoladamente (ALMEIDA, 1988).

Uma análise fitoquímica do extrato metanólico da *Baccharis pseudotenuifolia*, do gênero das carquejas, permitiu o isolamento de triterpenos, esteróides e flavonóides. Da fração clorofórmica foi isolado ácido oleanólico, que é um indicativo de um componente citotóxico importante, e α -espinasterol e da fração metanólica isolou-se os flavonóides naringenina e eriodictiol (flavononas), aromadendrina; 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona (flavonas), canferol, quercetina; 3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona (flavonóis), quercetina-3-O-glucosídeo e quercetina-3-O ramnosídeo (glicosídeos) (MOREIRA *et al.*, 2003).

A *Cynara scolymus* (alcachofra), cultivada no Brasil, apresentou em sua composição química os flavonóides cinarosídio e escolimosídeo, que são os maiores constituintes juntamente com a cinaropictina, 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 antibacteriana, 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. Elas defendem as plantas do ataque de patógenos e desenvolvimento de microorganismos, ou tornando-as repelentes, atraentes ou tóxicas para insetos e/ou animais herbívoros. Os aleloquímicos são também comumente encontrados nos fungos, bactérias e artrópodes e em menores quantidades em outros seres vivos. Conhece-se cerca de 10.000 metabólitos diferentes (ALMEIDA, 1988).

A Tabela 1 mostra as classes dos aleloquímicos encontrados e suas principais características.

TABELA 1: Abrangência e efeito de compostos vegetais bioativos.

Classe	Abrangência	Efeitos
Terpenóides		
Monoterpeno	Vasta abrangência (óleos essenciais).	Gosto ou odor atrativo.
Sesquiterpenos	Angiospermas, óleos essenciais e resinas.	Amargo, tóxico.
Diterpenos	Vasta abrangência, presentes em resinas e látex.	Alguns têm efeitos tóxicos.
Esteróis	Abrangência específica.	Sinalizador.
Saponinas	Abrangência restrita.	Tóxico, antibiótico.
Cardenólídeos	Abrangência restrita.	Tóxico, amargo.
Politerpenos	Abrangência restrita.	Inibidor
Carotenóides	Abrangência ampla.	Coloração. Pigmento de proteção à radiação.
Terpenos halogenados	Algas Marinhas.	Tóxico.
Fenóis		
Fenóis simples	Abrangência universal nas folhas e córtex.	Antibiótico, alelopático e detergente.
Fenóis halogenados	Algas marinhas	Amargo.
Flavonóides	Distribuição universal.	Coloração, pigmento de proteção contra raios UV, antioxidante.
Taninos	Vasta abrangência.	Amargo, antibiótico.
Dibenzofurano	Líquens.	Antibiótico, tóxico.
Compostos nitrogenados		
Alcalóides	Vasta abrangência nas angiospermas, em raízes, folhas e frutos.	Tóxico, amargo.
Aminas e peptídeos	Largamente distribuídas nas angiospermas, especialmente nas flores.	Aroma Atraente.
Poli-peptídeos cíclicos	Abrangência restrita.	Tóxico, antibiótico.
Aminoácidos não protéicos	Freqüente.	Muitos são tóxicos.
Glicosídeos cianogênicos	Abrangência restrita em certos frutos e folhas.	Tóxico.
Glucosinato	Abrangência restrita.	Acre (gosto ácido), amargo.
Outras Substâncias Secundárias		
Cumarina	Larga abrangência	Alelopático, antibiótico.
Poliacetileno	Larga abrangência	

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. Nas células, os metabólitos secundários hidrofílicos são armazenados nos vacúolos e os lipofílicos acumulam em ductos de células mortas ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos (membranas, ceras cuticulares e lignina). Este armazenamento é de fundamental importância para a sobrevivência do vegetal.

A Figura 3 mostra as rotas de produção dos metabólitos secundários. As origens destes podem ser resumidas a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2000a).

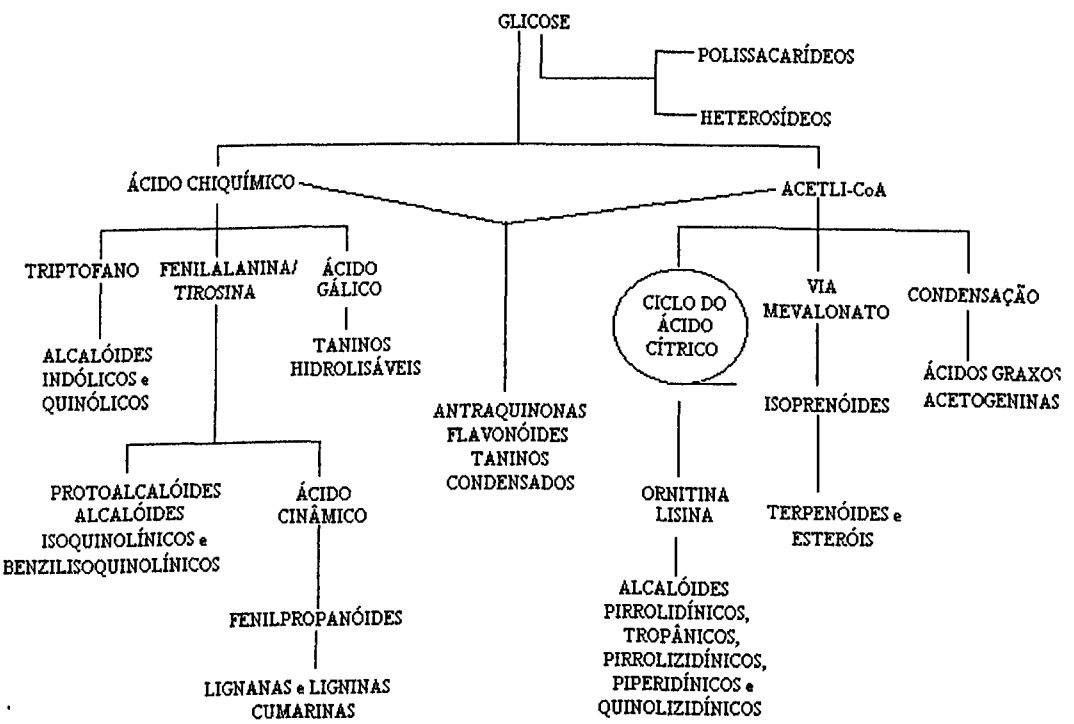


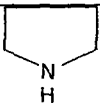
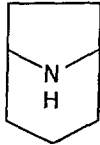
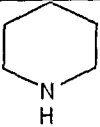
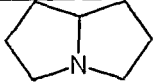
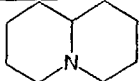
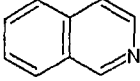
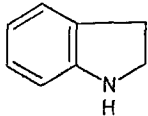
FIGURA 3: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

1.3.1.1- Alcalóides

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas. Na sua maioria, possuem caráter alcalino.

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais, podem ser encontrados em todas as partes da planta, havendo um acúmulo preferencial nos tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. São sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos. Por isso não aparecem em células jovens antes de ocorrer à formação destas estruturas. O local de estoque dos alcalóides freqüentemente é diferente daquele no qual é produzido (HENRIQUES, KERBER e MORENO, 2000). A Tabela 2 mostra as classes de alcalóides e a reação que provoca em humanos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

TABELA 2: Tipos de alcalóides, aminoácidos precursores e exemplos das classes.

Classe de alcalóide	Estrutura	Precursor biossintético	Exemplos	Usos em humanos
Pirrolidínico		Ornitina (aspartato)	Nicotina	Estimulante, sedativo, tranqüilizante.
Tropânico		Ornitina	Atropina Cocaína	Prevenção contra espasmos intestinais, antídoto para venenos. Anestésico local, estimulante.
Piperidínico		Lisina (ou acetato)	Coniína	Veneno (paralisa os neurônios motores).
Pirrolozidínico		Ornitina	Retrorsina	Nenhum.
Quinilizidínico		Lisina	Lupinina	Restabelecimento do ritmo cardíaco
Isoquinolínico		Tirosina	Codeína Morfina	Analgésico, antitussígeno. Analgésico.
Indólico		Triptofano	Psilocibina Reserpina Estricnina	Alucinógeno. Hipertensão e psicoses Veneno para ratos.

Os alcalóides contendo um átomo de nitrogênio no anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros. As substâncias com o átomo de nitrogênio

não pertencente a um sistema heterocíclico são denominados de protoalcalóides. Compostos nitrogenados com ou sem anéis heterocíclicos que não sejam derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (Figura 4) (HENRIQUES, KERBER e MORENO, 2000).

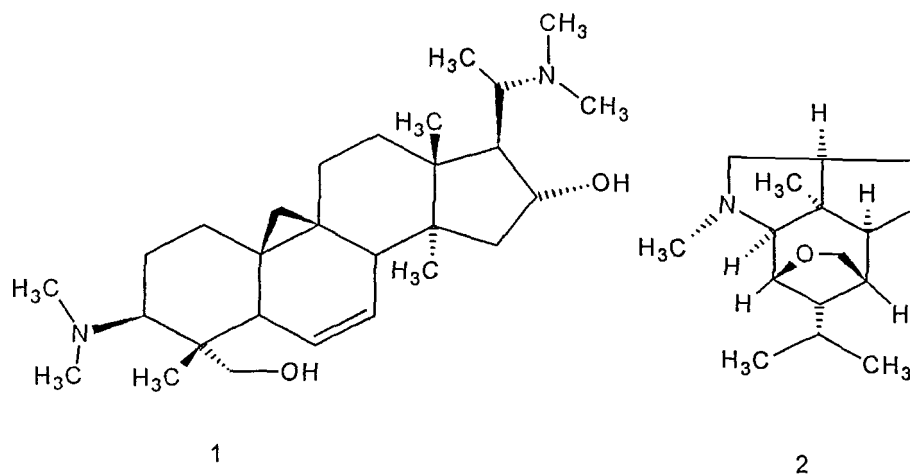


FIGURA 4: A dendrobina (1) é um exemplo de protoalcalóides, enquanto que a ciclomicrofilina (2) representa um alcalóide.

1.3.1.1.1- Alcalóides Tropânicos

Apresentam em comum uma estrutura bicíclica, denominada tropano 8-metil-8azabicyclo[3,2,1] octano (Figura 5). O anel tropânico é formalmente constituído pelos anéis pirrolidina e piperidina.

São conhecidos cerca de 40 alcalóides tropânicos, sendo em sua maioria derivados da pirrolidina. Em algumas espécies, os alcalóides encontram-se praticamente nas raízes, indicando uma deposição nas mesmas. Os 85 gêneros da família Solanaceae possuem misturas de alcalóides tropânicos nas folhas e sementes, enquanto que as flores e as raízes apresentam misturas mais complexas de ésteres tropínicos e de outros derivados tropânicos.

A identificação dos alcalóides tropânicos pode ser realizada com os reativos gerais para alcalóides, como Dragendorff, Mayer e Bertrand (BACCHI, 2000).

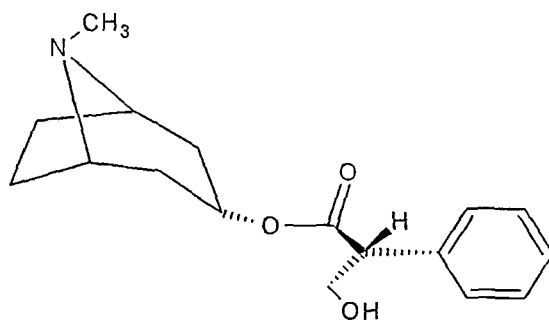


FIGURA 5: A Atropina representa classe dos alcalóides tropânicos. É retirada da *Atropa belladonna* L.

1.3.1.1.2- Alcalóides Indólicos

São conhecidos em torno de 2000 alcalóides indólicos. Essa classe pode ser subdividida em dois grupos: o grupo maior, o dos indólicos monoterpênicos e os demais alcalóides indólicos. A síntese desses compostos continua sendo um desafio e quase todos os membros desse grupo usados na terapêutica ainda são obtidos a partir de extratos vegetais.

Os alcalóides indólicos possuem grande importância econômica devido às suas atividades farmacológicas, como por exemplo, a ajmalicina e a ioimbima, usadas em distúrbios do fluxo sanguíneo.

As drogas vegetais são raramente utilizadas na terapia devido à variação do conteúdo de seus componentes ativos. Dessa maneira, os alcalóides são quase sempre utilizados na sua forma purificada, possibilitando sua dosagem precisa (SCHRIPEMA, DAGNINO e GOSMANN, 2000).

A Figura 6 apresenta exemplos de dois alcalóides indólicos.

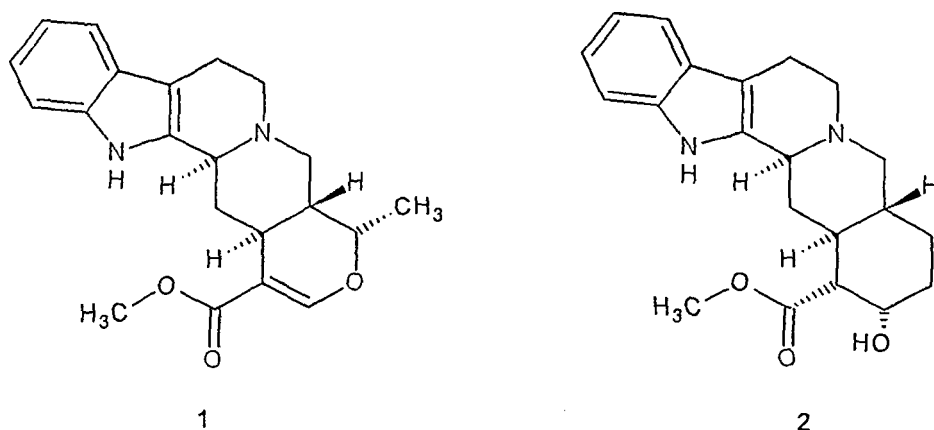


FIGURA 6: Exemplos de alcalóides indólicos, que apresentam atividades farmacológicas: (1) - ajmalicina, (2) – ioimbima.

1.3.1.1.3- Alcalóides esteroidais

Encontram-se na natureza livres ou como glicosídeos, que são denominados glicoalcalóides esteroidais. Apresentam em geral as mesmas propriedades dos outros grupos de alcalóides, são compostos naturais básicos, que em sua forma livre são solúveis em solventes orgânicos, e seus sais são solúveis em água.

São isolados tanto de vegetais quanto de animais, e em geral, são compostos relativamente tóxicos ou muito tóxicos, que provavelmente cumprem atividades defensivas nos organismos que os produzem. Os mecanismos de toxicidade são diversos, dentre os quais se encontram os bloqueios seletivos dos canais de sódio e despolarização das membranas de neurônios e células musculares. Muitos alcalóides são teratogênicos (causa defeitos congênitos), além de produzir intoxicações agudas em doses maiores (CHIESA e MOYNA, 2000).

A Figura 7 apresenta um exemplo de alcalóide esteroidal.

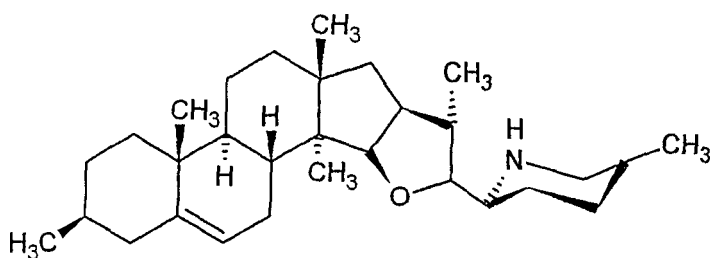


FIGURA 7: Estrutura da solasodina.

1.3.1.2- Óleos Voláteis

São misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas, também chamadas de óleos essenciais. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída das estruturas básicas:

- **Fenilpropanóides:** formam-se a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Depois sofrem reduções enzimáticas produzindo propenilbenzenos; oxidações com degradação das cadeias laterais, gerando aldeídos aromáticos; ciclizações enzimáticas intramoleculares

dando cumarinas. A Figura 8 mostra a estrutura do ácido *trans*-cinâmico, um exemplo de fenilpropanóide.

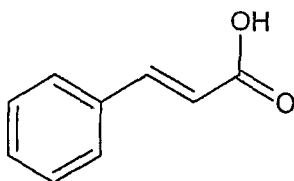


FIGURA 8: Ácido *trans*-cinâmico, um fenilpropanóide.

- **Terpenóides:** os compostos terpênicos nos óleos voláteis são, principalmente, os monoterpenos (cerca de 90%), que são divididos em três subgrupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos e os sesquiterpenos. A Figura 9 é um exemplo de substância terpenóide com ação inseticida.

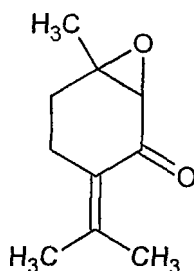


FIGURA 9: Estrutura da 1,2-epóxi-pulegona.

Os óleos essenciais são abundantemente em angiospermas dicotiledôneas. Podem ocorrer nas estruturas secretoras especializadas e podem ser estocados em todos os órgãos da planta, variando sua concentração.

Os óleos voláteis são usados em função de suas propriedades terapêuticas e para aromatização de formas farmacêuticas destinadas a uso oral. Muitos apresentam alta toxicidade, podendo levar a uma intoxicação aguda (reações cutâneas), ou até crônica (SIMÕES e SPITZER, 2000b).

1.3.1.3- Flavonóides

São conhecidos mais de 4.200 flavonóides. Constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários. Estão presentes em abundância nas angiospermas.

Protegem as plantas contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de insetos, fungos, vírus e bactérias. São antioxidantes. Os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, galhos,

raízes ou frutos, podendo apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra.

A Figura 10 mostra o esqueleto básico dos flavonóides (1) e a estrutura da tambulina (2), exemplo de um flavonóide.

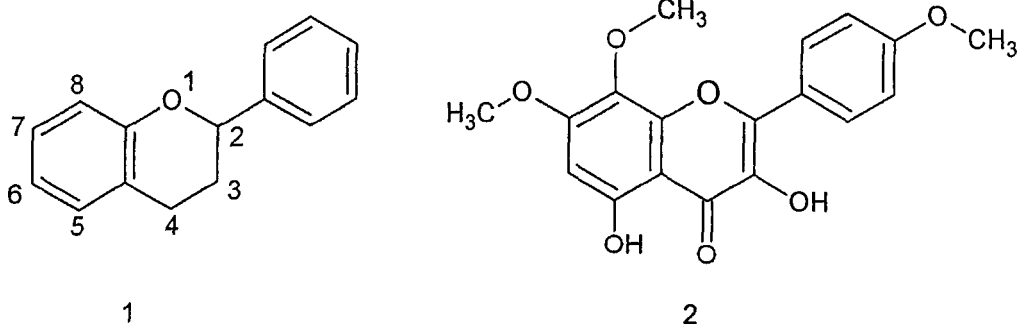


FIGURA 10: Esqueleto básico dos flavonóides (1) e a estrutura da tambulina (2).

Devido ao grande número de flavonóides existentes, os representantes estão agrupados por suas características químicas e biossintéticas:

- **Flavonas, flavonóis e seus o-heterosídeos:** fazem parte de um grande grupo de flavonóides de origens biossintéticas muito próximas. Como os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila, essas duas classes são em geral classificadas juntas. Suas cores variam do branco ao amarelo. As flavonas e flavonóis naturais são freqüentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. Os O-heterosídeos estão ligados com um ou mais açúcares pelos grupos hidroxilas, por uma ligação hemiacetal. Apigenina e luteolina são as flavonas mais abundantes encontradas em plantas. Os flavonóis mais encontrados são galangina, canferol, quercetina e miricetina (LARCHER, 2000). A Figura 11 mostra exemplos deste grupo.

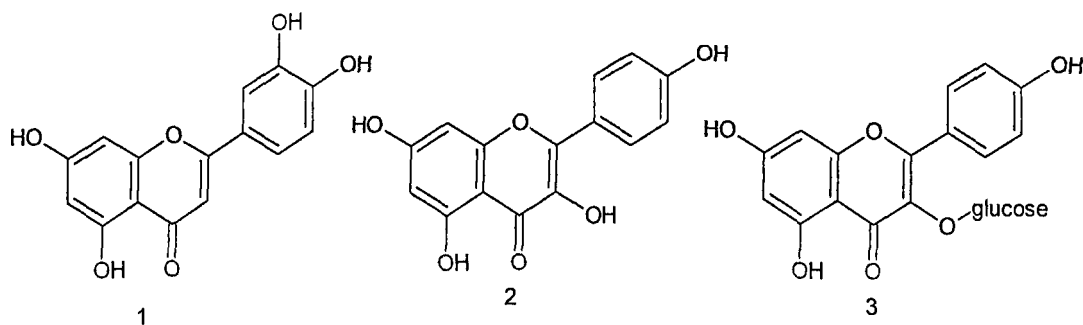


FIGURA 11: Exemplos de estruturas de flavonas, flavonóis e flavonóide O-heterosídeo: luteolina (1), canferol (2), quercetina-3-O-glucosídeo (3).

Flavonóides C-Heterosídeos: estes flavonóis são diferenciados dos O-heterosídeos pela ligação açúcar-genina. Sua principal característica é a resistência à hidrólise ácida. A Figura 12 mostra um exemplo de um flavonóide C-glicosídeo.

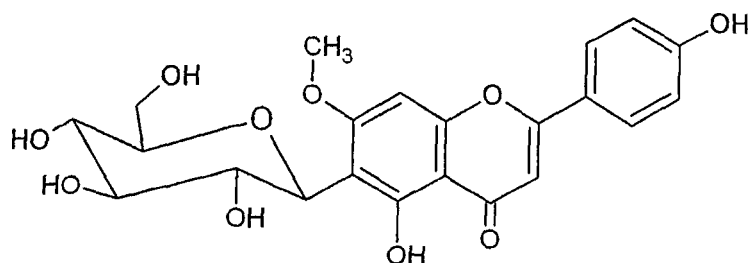


FIGURA 12: Estrutura da swertisina

- **Antocianos:** são responsáveis pelas cores laranja, rosa, escarlate, vermelho, violeta e azul das pétalas de flores e frutos de vegetais superiores. Possuem algum interesse farmacológico devido à suas atividades antiinflamatórias e antiedematogênicas. Os antocianos podem fazer parte de grandes complexos coloridos com outros compostos ou metais.

A Figura 13 mostra a estrutura da malvidina, uma das antocianidinas mais freqüentemente encontradas na natureza.

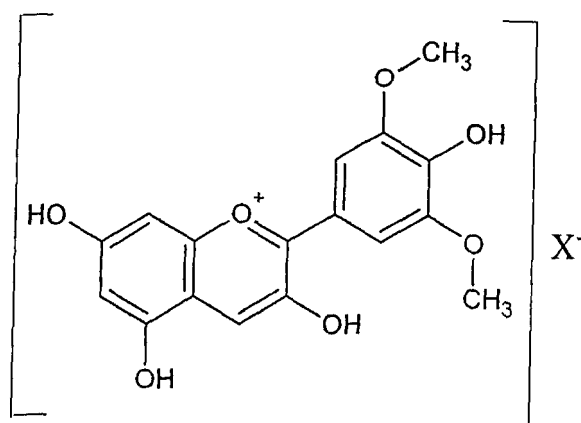


FIGURA 13: Estrutura representativa da malvidina.

- **Chalconas:** Apresentam pigmentação amarela que passa a vermelha em meio alcalino. São importantes devido a coloração que produzem, pois estão implicadas na polinização como atraentes de insetos ou pássaros, além de proteger contra o calor e a luz. São encontrados em toda a planta, inclusive nas flores,

contribuindo para a pigmentação da corola. A Figura 14 mostra a culculcanina B, um exemplo de chalcona.

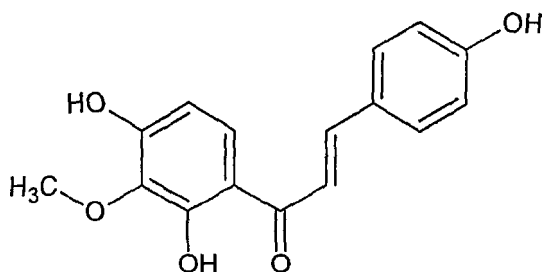


FIGURA 14: Estrutura da culculcanina B.

- **Auronas:** o termo aurona foi proposto em razão da cor de ouro e da semelhança estrutural com as flavonas. A maior parte das auronas de origem natural apresenta a configuração *Z*-olefina, sendo chamadas de *Z*-auronas. São encontradas na forma de heterosídeos. A Figura 15 apresenta o esqueleto básico das auronas.

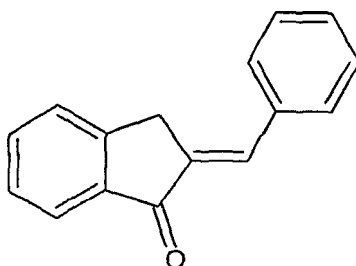


FIGURA 15: Esqueleto básico das auronas.

- **Diidroflavonóides:** esses flavonóides apresentam centro de assimetria em suas moléculas. Muitos foram identificados na forma de heterosídeos. Protegem as plantas contra doenças causadas por microorganismos. Podem reagir com algumas enzimas e interferir em processos biológicos (atividade farmacológica). As diidrochalconas influenciam no gosto, podendo ser amargo ou doce. A Figura 16 apresenta exemplos de diidroflavonóis e diidrochalconas.

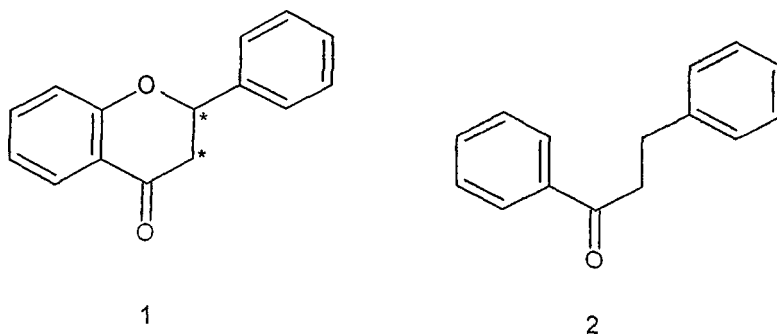


FIGURA 16: Estruturas básicas de diidroflavonóis (1) e diidrochalconas (2).

- **Isoflavonóides:** encontram-se em estruturas ciclizadas como os pterocarpanos. Algumas possuem o carbono suplementar (rotenóides). Os isoflavonóides são formados como os demais flavonóides, via chalconas. Comportam-se como fitoalexinas – substâncias produzidas pela planta devido a uma infecção por um agente patogênico. Os pterocarpanos representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavononas. A forma mais reduzida desta classe é a isoflavana. A Figura 17 apresenta exemplos de isoflavonóides.

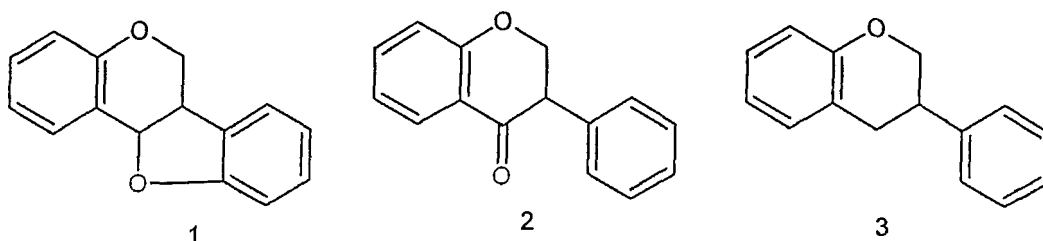


FIGURA 17: Estruturas: pterocarpano (1), isoflavonona (2) e isoflavana (3).

- **Neoflavonóides:** são compostos naturais, associados estruturalmente e biogeneticamente aos flavonóides e isoflavonóides. Os mais abundantes são as 4-arilcumarinas e as dalbergionas, que estão apresentadas na Figura 18.

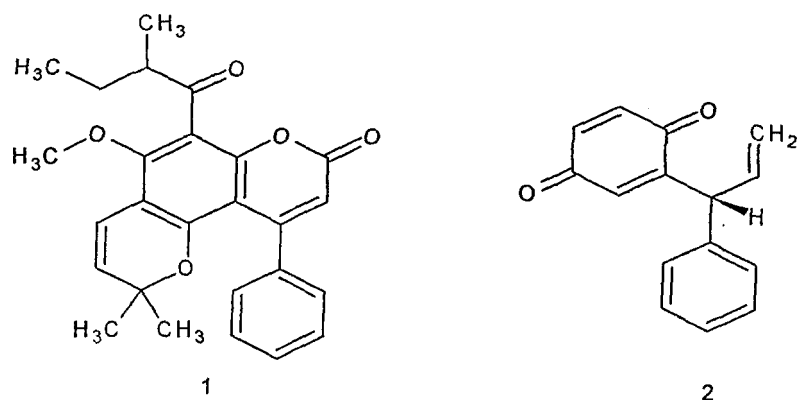


FIGURA 18: 4-arilcumarinas (1) e dalbergionas (2).

- **Biflavonóides:** são dímeros de flavonas e flavononas. Diferenciam-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à sua origem biogenética comum. A amentoflavona e seus metil-éteres são exemplos desta classe. Os biflavonóides são encontrados em grandes quantidades em diversas plantas, e em diferentes órgãos. Age como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos e protege contra os raios ultravioletas nas folhas. São estimulantes cardíacos ou anti-inflamatórios. Um exemplo de biflavonóide está apresentado na Figura 19.

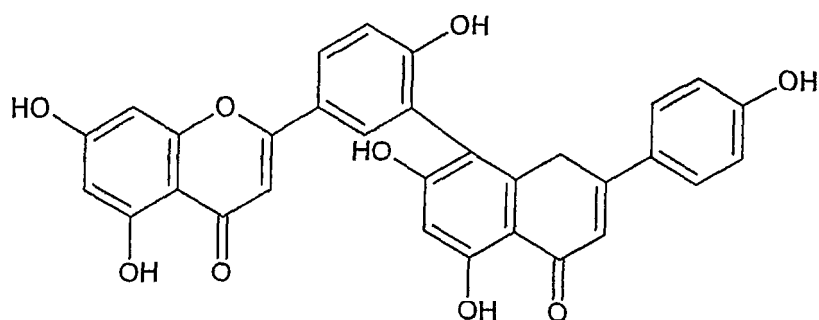


FIGURA 19: Estrutura da amentoflavona.

Os flavonóides são utilizados para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e como cofator da vitamina C. Possuem ação anticancerígena, antivirais, anti-hemorrágica (ZUANAZZI, 2000).

1.3.1.4- Taninos

São substâncias fenólicas solúveis em água. Formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas (é a base para as propriedades de controle de insetos, fungos e bactérias). São responsáveis pela

adstringência de muitos frutos. São divididos em duas classes: taninos condensados (Figura 20) e taninos hidrolisáveis (Figura 21) (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios. São utilizados no curtimento do couro (SANTOS e MELLO, 2000b).

Os taninos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à sua precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante. Tem reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações, frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens tornam-se impalatáveis aos fitófagos e, ainda combinado a algumas proteínas, estes tecidos resistem fortemente à putrefação (MONTEIRO, 2005).

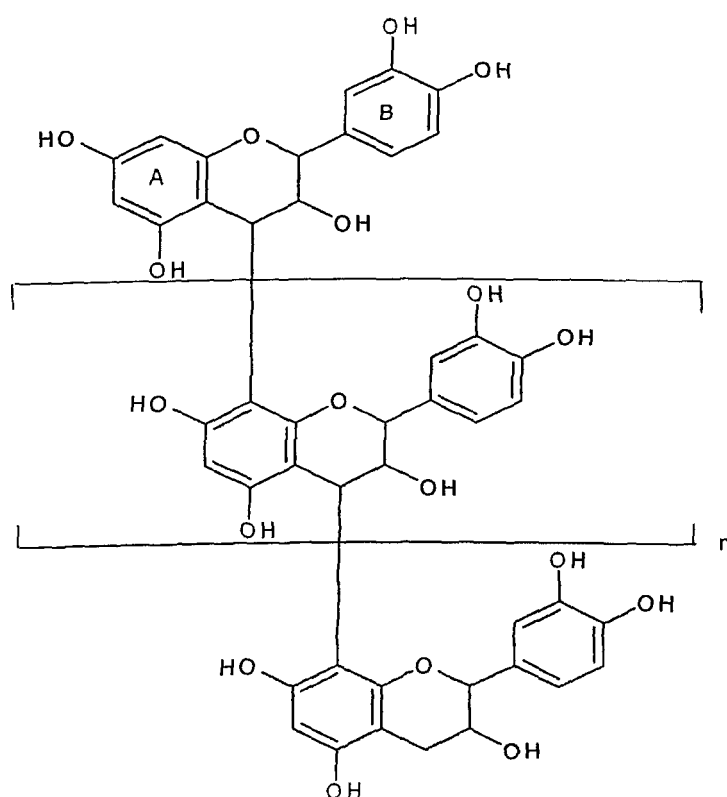


FIGURA 20: Estrutura geral de um tanino condensado, onde n varia de 1 a 10.

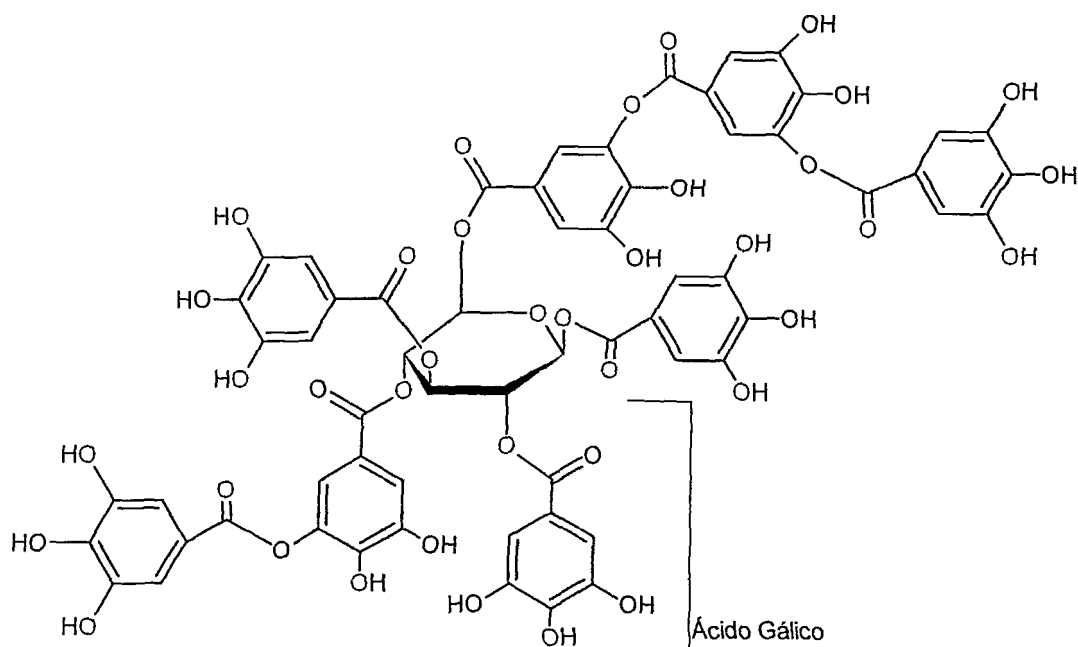


FIGURA 21: Tanino hidrolisável de *Rhus semialata*.

1.3.1.5- Quinonas

São compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Apenas algumas nafto-, antra- e fenantraquinonas podem ser classificadas como substâncias com caráter aromático.

Em função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligações duplas e os grupos carbonílicos conjugados estão inseridos, têm-se os três grupos principais de quinonas: *benzo-*, *nafto-* e *antraquinonas*. Também são encontradas na forma de quinonas terpênicas e policíclicas.

A estrutura quinóide condiciona uma alta reatividade e as quinonas são agentes fortemente oxidantes. Em meio alcalino, apresenta uma intensa coloração púrpura a violeta, base para a detecção de compostos quinônicos, denominada reação de Bornträger.

São conhecidos mais de 1.500 quinonas, encontradas em bactérias, fungos, líquens, gimnospermas e angiospermas; no reino animal, em ouriços-do-mar e certos artrópodes (como cochonilhas) e em besouros bombardeadores.

As quinonas desempenham um papel de defesa da planta contra insetos e outros patógenos. A benzoquinona primina (Figura 22) demonstrou uma ação

protetora contra insetos fitófagos. A atividade laxante é a responsável pela utilização da maioria dos vegetais que contêm quinonas, além de serem utilizadas como corantes alimentares (FALKENBERG, 2000b).

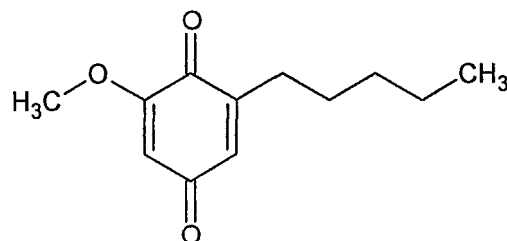


FIGURA 22: Estrutura da benzoquinona primina.

1.3.1.6- Heterosídeos cardioativos

São caracterizados pela sua alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco. Ocorrem como glicosídeos esteroidais. Constituem um grupo químico perfeitamente individualizado e de grande homogeneidade estrutural e farmacológica.

No reino vegetal, são restritos às angiospermas, indicando que existem algumas características especiais no metabolismo esteroidal de plantas com flores. A distribuição desses compostos é restrita e esporádica. Todos os órgãos das plantas podem conter heterosídeos cardioativos, sendo que, salvo raras exceções, as porcentagens não ultrapassam 1%.

Admite-se que os cardenolídeos sejam resultantes da condensação de um derivado da série do pregnano (20-cetopregnano) e uma unidade dicarbonada (acetato) ou tricarbonada (propionato) (RATES, 2000).

A digoxina, um heterosídeo cardioativo, está apresentada na Figura 23.

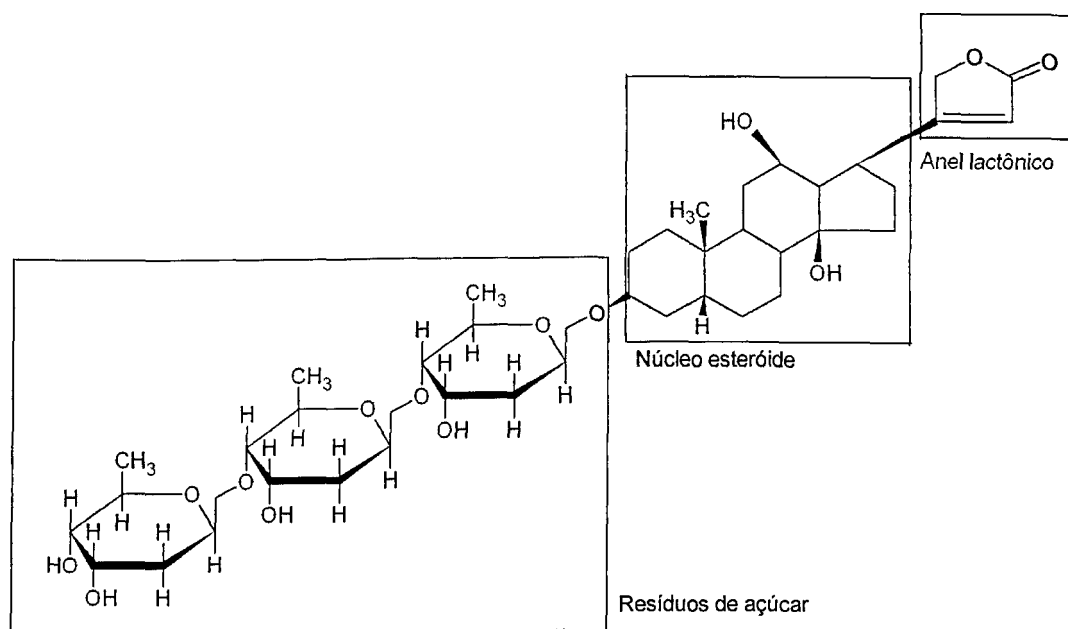


FIGURA 23: Exemplo de estrutura de heterosídeo cardioativo, a digoxina.

1.3.1.7- Saponinas

São glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Ocorrem em misturas complexas, devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares ou ainda devido à presença de diversas agliconas. As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental de agliconas (saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas) ou pelo seu caráter básico (pela presença de uma amina), ácido (presença de um grupamento carboxila) ou neutro.

As saponinas esteroidais e triterpênicas apresentam uma distribuição diferenciada no reino vegetal. Por outro lado, as saponinas triterpênicas encontram-se predominantemente em dicotiledôneas. São utilizadas principalmente como expectorantes e diuréticas (SCHENKEL, GOSMANN e ATHAYDE, 2000). A regra natural das saponinas é comumente estar na defesa contra ataques de patógenos e pestes (HARALAMPIDIS *et al.*, 2001). Na Figura 24 pode-se observar um exemplo de uma saponina.

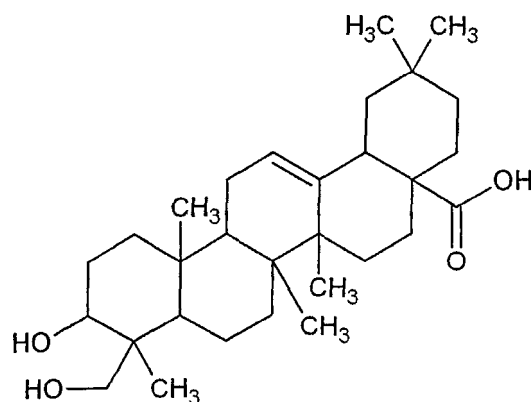


FIGURA 24: Estrutura da hederagenina.

1.3.1.8- Cumarinas, Cromonas e Xantonas.

As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias, sendo que as estruturas mais simples são as mais encontradas. Cerca de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais.

As cromonas representam um pequeno grupo de substâncias naturais, cujas estruturas são isômeros de cumarinas. As xantonas são metabólitos secundários, formadas pela combinação das vias do chiquimato e do acetato.

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina. Podem ser encontradas em todas as partes de uma planta, freqüentemente como misturas. Possuem odor característico, sendo amplamente usada como aromatizante em alimentos industrializados. Suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição (KUSTER *et al.*, 2000).

A Figura 25 mostra uma cumarina com atividade farmacológica, representante de uma cromona e uma xantona (PINEIRO, 2003).

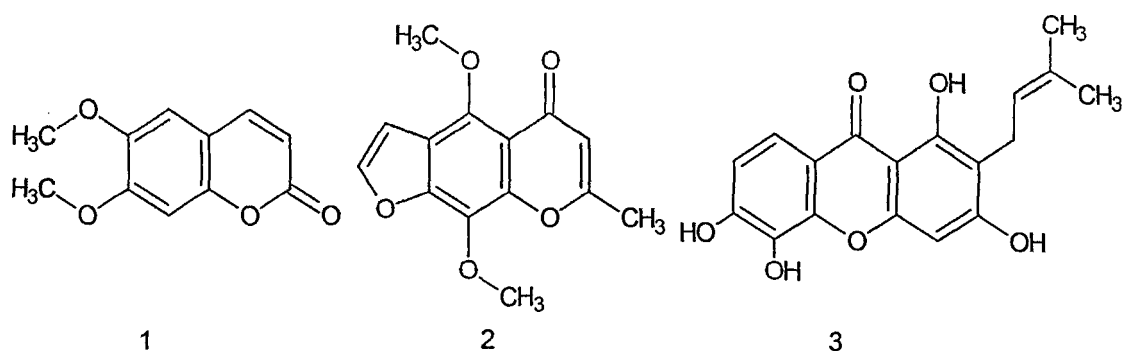


FIGURA 25: Estrutura da escoparona (1), quelina (2) e 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona (3).

1.3.2- Análise Fitoquímica

Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas. Assim, é necessária uma pesquisa fitoquímica, que tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença (FALKENBERG, 2000a). Tem-se desenvolvido uma série de métodos fitoquímicos para a detecção preliminar dos diferentes constituintes químicos nas plantas, baseados na extração destes com solventes apropriados e na aplicação de provas de coloração. A utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido freqüentemente incorporada à pesquisa fitoquímica (NOLDIN, 2003).

Em termos gerais, uma análise fitoquímica deve compreender quatro etapas bem definidas:

1. Recolhimento e classificação botânica da espécie em estudo;
2. Extração, separação e purificação de constituintes químicos;
3. Determinação estrutural;
4. Ensaios biológicos e farmacológicos.

A identificação de aleloquímicos envolve bioensaios direcionados de isolamento. Solventes orgânicos são usados para obtenção dos extratos de diversas partes da planta. Os métodos mais apropriados de extração são aqueles que se aproximam mais à forma de como a planta elimina esses aleloquímicos. Se os bioensaios mostram alguma atividade de determinado extrato, o mesmo é

fracionado, geralmente por técnicas cromatográficas, com o objetivo de isolar os componentes ativos. Subseqüentemente, as estruturas daqueles compostos ativos são determinadas, usando técnicas modernas de ultravioleta e infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H , cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, raios X (quando os compostos formem cristais) e outras técnicas (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993; IKAN, 1991; MATOS, 1988).

1.3.3-Função nos Organismos

As reações bioquímicas não ocorrem independentes em um mesmo produtor, embora sejam classificadas como metabolismo primário e metabolismo secundário. Alterações no primeiro sistema afetam também o segundo, embora o contrário não seja verdadeiro. Além disso, muitos metabólitos secundários são formados por seqüências de reações análogas às do metabolismo primário, tornando a linha divisória entre os processos primários e secundários não tão nítida (SANTOS, 2000a).

A principal função dos produtos secundários é proteger o organismo que o produz, mas servem também como meio de comunicação. O conjunto de produtos químicos liberados por uma planta constitui um sinal que permite reconhecer se quem o emitiu é benéfico ou prejudicial. Assim, a produção das substâncias alelopáticas estabelece uma verdadeira guerra química entre os integrantes das comunidades, onde cada um luta por sua integridade.

A ação destes compostos não é muito específica, podendo desempenhar várias funções que dependem da concentração, translocação e destoxicação do que da própria composição química. São responsáveis pela prevenção da decomposição das sementes, interferem na dormência destas e também na das gemas e influenciam as relações com outras plantas (ALMEIDA, 1988).

A alelopatia também exerce um papel importante na proteção contra pragas. Os aleloquímicos podem ser venenosos para insetos que dela se alimentam. O mecanismo de defesa das plantas contra animais superiores (como por exemplo, o homem) é semelhante. Estes escolhem os vegetais de que se alimentam principalmente pela palatabilidade e não pela aparência ou gosto (ALMEIDA, 1988).

1.3.4-Liberação no Meio Ambiente

As plantas podem produzir os aleloquímicos em todos os seus órgãos, mas a concentração nos tecidos depende de diversos fatores, tais como a deficiência de água e de nutrientes, que fazem aumentar a produção dos aleloquímicos (ALMEIDA, 1988).

Muitos destes compostos são autotóxicos. As plantas precisam de um mecanismo de defesa contra eles: elas podem mantê-los biologicamente inativos; isolá-los em compartimentos das células, o que os impede de interferir no metabolismo; ou a liberação para o meio ambiente, que é uma forma freqüente de escapar dos autotoxícos, sem interferir nas energias das plantas que os produzem.

Estas liberações podem ocorrer por três meios:

- **Volatilização:** é comum nas plantas aromáticas, mas o fato de uma planta ser aromática não significa que os produtos exalados por ela sejam alelopáticos. Uma vez volatilizados, podem ser absorvidos diretamente pela cutícula das plantas vizinhas, condensados no orvalho, ou entrarem no solo, onde permanecem no estado volátil, ou se dissolvem na água. Expande-se rapidamente no ar, fazendo sentir os efeitos a distâncias consideráveis.

- **Exsudação pelas Raízes:** as plantas exsudam pelas raízes inúmeros compostos químicos, em pequenas quantidades. É difícil identificar os compostos alelopáticos vindos das plantas, porque estas substâncias são provenientes das raízes, dos microorganismos ou da decomposição de resíduos orgânicos. A quantidade e a natureza química dos exsudados diferem com a espécie e a idade da planta, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana e composição do solo onde se encontram as raízes.

- **Lixiviação:** é a remoção de substâncias químicas das plantas, vivas ou mortas por ação da água, o que na natureza se dá através da chuva, neblina ou orvalho. A quantidade de lixiviados depende das espécies, constituição e idade dos tecidos vegetais, condições fotoclimáticas e da intensidade da lavagem, e no caso de plantas mortas, do seu estado e tipo de decomposição, temperatura e condições de umidade do solo. Os lixiviados contêm substâncias orgânicas e inorgânicas, que podem ser tóxicas (alcalóides, terpenóides, ácidos orgânicos e fenólicos) ou estimulantes (aminoácidos, açúcares e vitaminas). A distribuição no

solo não é uniforme, pois depende da densidade de plantas vivas ou da quantidade de plantas mortas. (ALMEIDA, 1988).

1.3.5-Mecanismo de ação

Como os aleloquímicos atuam são objetos de estudos de vários pesquisadores, mas o processo ainda é pouco conhecido. As funções que afetam o mecanismo de atuação são muito similares aos dos herbicidas. A dificuldade de entender estes processos é porque afetam mais de uma função e os efeitos colaterais dificultam sua diferenciação dos principais (ALMEIDA, 1988).

1.3.6-Duração da Atividade Alelopática

As plantas e microorganismos produzem compostos químicos, que, se presente nas concentrações apropriadas, podem inibir ou estimular o crescimento de outras plantas e microorganismos. É também evidente que muitos fatores, genéticos ou ambientais, afetam a quantidade de fitotoxinas potenciais produzidas. Uma vez que as fitotoxinas são liberadas para o meio ambiente, elas começam a se decompor ou por microorganismos ou por ações químicas que não envolvam microorganismos. Mas deve-se lembrar que alguns compostos são mais estáveis no solo do que outros e que esta estabilidade depende consideravelmente do tipo de composto e dos vários fatores ambientais envolvidos. Assim, o efeito do potencial alelopático depende basicamente das razões relativas de adição dos aleloquímicos no meio ambiente e sua decomposição e/ou inativação.

Vários fatores genéticos e ambientais são conhecidos porque controlam o movimento dos aleloquímicos das plantas doadoras, a disponibilidade e a atividade dos aleloquímicos no solo, regulando a resposta das plantas receptoras ou dos microorganismos. Provavelmente, fatores de estresse afetam esta resposta das plantas receptoras a um aleloquímico específico, assim como também afeta a produção dos aleloquímicos de defesa das plantas receptoras (RICE, 1984).

1.4- *Caryocar brasiliense*

Caryocar brasiliensis, também conhecido como piqui ou pequi. Este nome origina-se do Tupi “pyqui”, onde py = casca e qui = espinho, referindo-se aos espinhos do endocarpo do fruto (parte dura do caroço).

O pequi ocorre no cerrado e se distribui pelos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins. (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Pertence à família Caryocaraceae, que engloba plantas exclusivas da América tropical, representada por dois gêneros e cerca de 25 espécies, das quais aproximadamente 15 são encontradas em nossa flora. Os gêneros possuem características diferenciadas: o *Caryocar* descrito por Lineu possui folhas opostas; ovário de 4-6 loculares, sem disco; sementes sem endosperma, com embrião reto, formado por um hipocótilo crasso e cotilédones reduzidos, incumbentes; enquanto que o *Anthodiscus* descrito por G. Mey apresenta folhas alternas; ovário de 8-12 loculares, envolvido por um disco carnosos; semente com endosperma e embrião com rostelo cilíndrico, delgado, enrolado em espiral. (BARROSO *et al.*, 2004; JOLY, 1998).

O *Caryocar brasiliense* Camb. É uma árvore característica dos cerrados do Brasil Central. É uma árvore hermafrodita de até 7 m de altura, velutino-pubescente salvo as flores e os frutos. Pelo formato beleza da sua copa e o arranjo externo das suas alvas flores, o pequizeiro é considerado uma planta ornamental. O pequizeiro é uma das importantes plantas para alimentação do homem do campo e que cada vez mais conquista destaque nos cardápios dos restaurantes de comidas típicas da região. Floresce de junho a outubro e frutifica de agosto a janeiro (ALMEIDA e SILVA, 1994; ALMEIDA *et al.*, 1998). A Figura 26 apresenta uma árvore de pequi.



FIGURA 26: *Caryocar brasiliense*.

As raízes são usadas para a preparação de cavernames de pequenas embarcações (ALMEIDA *et al.*, 1998). Com madeira bastante resistente, o caule é usado como fonte de carvão siderúrgico (ALMEIDA e SILVA, 1994). A madeira apresenta $1,185\text{gcm}^{-3}$ de densidade. É castanho-amarelada muito fibrosa, muito resistente e por isso escolhida para obras que requerem durabilidade e grande esforço contra o esmagamento. São empregados para berço das moendas, calços de bate estacas e aplicações semelhantes. Ainda se presta para moirões, construções civis e navais. A circunferência, na base do tronco, pode chegar a 2 m. A casca é escura e gretada. A árvore começa com ramificação pouco acima da base; os galhos são grossos, longos e um pouco inclinados. A copa é larga, os galhos se estendem lateralmente (PEIXOTO, 1973).

Suas folhas são opostas, compostas trifolioladas com as bordas recortadas, longo-pecioladas, com estípulas caducas deixando cicatriz interpeciolar; limbo oval, elíptico ou largamente oblongo; base aguda e obtusa no folíolo central e desigual nos folíolos laterais; margem crenada; nervação sulcada na face ventral e saliente na face dorsal; pecíolo com 3 a 13,5 cm de comprimento (ALMEIDA *et al.*, 1998).

O fruto contém 1 a 3 sementes e é considerado do tipo drupa, globosa, quase redondo, de casca ou pericarpo acinzentado ou verde-amarelado, com o diâmetro de 6 cm ou um pouco maior. O mesocarpo ou polpa carnuda é abundante, brancacenta, espessa; contém cerca de 36% de ácido tânico. A casca é muito aderente às sementes quando o fruto ainda está verde, mas se solta com facilidade quando está maduro. As sementes são muito duras e têm forma de rins, protegidas pelo endocarpo lignificado, lenhoso, revestido ou eriçado de espinhos ou acúleos finos e resistentes, que podem medir de 10 a 15 mm. O caroço é protegido por uma camada de 3 a 5 mm de espessura, amarela. A amêndoa compõe-se de dois cotilédones de massa branca, oleosa, pouco resistente, adocicada; o embrião carnoso é bem desenvolvido e o fruto maduro e fresco, recém colhido pesa entre 250 e 300 g (PEIXOTO, 1973).

A oferta natural dos frutos do *C. brasiliense* encontra-se ameaçada por diversos fatores, tais como a extração da madeira para a fabricação de carvão siderúrgico. Outro fator que se destaca é uma séria praga: trata-se de uma lagarta de 15 mm de comprimento, de coloração clara, cabeça pequena, de cor marrom, com 3 pares de pernas torácicas e cinco abdominais. É uma lepidobroca, da família Sesiidae, gênero Carmenta, espécie não identificada. Ela ataca frutos jovens, por serem mais macios, penetrando até a semente, alimentando-se do embrião, fazendo com que os frutos caiam prematuramente (LOPES *et al.*, 2003).

Do fruto se extrai o óleo de pequi. Este óleo é muito utilizado contra gripes e bronquites, quando misturado com mel de abelha. Além do aspecto medicinal, esse óleo é usado na alimentação e na indústria de cosméticos para a fabricação de cremes e sabonetes. O óleo de pequi possui alto teor de caroteno (pró-vitamina A), riboflavina, fósforo, ferro e cobre. De todos os frutos analisados até o momento, com relação à vitamina A, pode-se afirmar que o pequi é o mais rico nesta vitamina. Além disto, o valor calórico do óleo de pequi ($931,1 \text{ cal}100\text{g}^{-1}$) é maior do que o do óleo de soja ($900 \text{ cal}100\text{g}^{-1}$) (ALMEIDA e SILVA, 1994; PEIXOTO, 1973).

Paula *et al.* (2000) determinou a composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de pequi encontrando pentanoato de etila, hexanoato de etila, tiglatato de propila, octanoato de etila, tuja-2,4(10)-dieno, hidrato de trans-sabinene, α -terpinol, geraniol, geraniol acetona, (E)- β -ionona, tetradecanal, heptadecano, dodecanoato de isoamila, ambretolídico, hexacosano e octacosano. Foi observado

que as estações seca e chuvosa influenciam no acúmulo, mas não na composição dos óleos essenciais dos frutos, enquanto das folhas, não se obteve óleos essenciais na amostra coletada durante a estação chuvosa.

O efeito fungitóxico dos extratos das folhas, do botão floral, mesocarpo externo, mesocarpo interno e da amêndoa de pequi foi testado sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. Os extratos de pequi não apresentaram atividade fungitóxica sobre os fungos citados, sendo que o extrato metanólico diferiu estatisticamente dos demais e o fungo *F. oxysporum* foi o que apresentou maior inibição quanto à porcentagem de germinação (MARQUES *et al.*, 2002).

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo:

1. Verificar a ação herbicida dos metabólitos secundários presentes nos extratos metanólicos de caule e raiz de pequi, sobre a planta daninha *P. maximum*, conhecida popularmente por capim colônia, em testes de germinação em caixas de germinação, avaliando o índice de germinação das sementes, as elongações da raiz e parte aérea das sementes germinadas.
2. Fracionar os extratos que apresentarem ações herbicidas, a fim de obter compostos mais puros.
3. Isolar e elucidar as estruturas contidas nas frações e subfrações ativas, com o auxílio de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CGEM).

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Obtenção Dos Extratos Brutos.

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. O material seco foi cortado em pequenas lascas, com o auxílio de uma serra.

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.

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

3.2 - Germinação:

Nos ensaios para a verificação do potencial herbicida, foram utilizadas, por triplicata, concentrações de zero (controle), 25, 50, 100 e 150 ppm do extrato, em H₂O bidestilada e deionizada usando caixas esterilizadas apropriadas para germinação (ver seção 3.2.1) e papel de germinação, previamente autoclavados. Cada parcela experimental foi constituída de 25 sementes de *Panicum maximum*.

As placas foram transferidas para um germinador onde permaneceram por um período de oito dias, a uma temperatura diurna de 30 °C e noturna de 20 °C, com uma variação de 1 °C, para mais ou para menos. O fotoperíodo foi ajustado para 12 horas. Desta forma, foram determinados os valores correspondentes da medição da parte aérea e da radícula, bem como o índice de germinação das sementes da planta testada.

Este processo foi realizado com ambos os extratos de caule e raiz de pequi.

3.2.1 – Esterilização das caixas de germinação

Para se realizar a esterilização das caixas de germinação, primeiramente estas foram lavadas com o auxílio de uma bucha e detergente neutro. Depois de bem enxaguadas e escorridas, utilizou-se uma solução 30% de clorofórmio, hipoclorito de sódio e etanol em água deionizada, que foi passada nas caixas, uma a uma. Enxagüaram-se as caixas em água corrente abundantemente, para garantir a retirada desta solução, pois o hipoclorito de sódio é um potente inibidor de germinação. Deixou-se que as caixas escorressem o excesso de água. Ambientaram-se as caixas com água deionizada. Foi retirado o excesso de água das caixas. Após este procedimento, colocou-se o papel de germinação nas caixas, estando estas prontas para serem usadas.

Este processo de esterilização foi feito para todas as germinações realizadas.

3.3 – Coleta de 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.

3.4 – Preparação da coluna seca

Foi incorporado em sílica-gel 60 (70-230 mesh ASTM, para cromatografia em coluna) 160,00 g do extrato bruto de raiz em uma proporção de 3:1 g sílica-gel: g de extrato. Em uma coluna de vidro de 10,0 cm de diâmetro e 1,20 m de comprimento, foi colocado aproximadamente 700,0 g de sílica-gel pura (aproximadamente 2/3 do tubo). Finalmente, acrescentou-se o extrato incorporado na sílica sobre a sílica pura, colocando um papel de filtro previamente cortado no tamanho e modelo do tubo, para evitar que a sílica incorporada ficasse com bolhas de ar em cada adição de solventes, o que evita o empacotamento da coluna.

O mesmo procedimento foi realizado com 140,0 g do extrato de caule de pequi.

3.5 – Obtenção das Frações

Foram usados seis solventes de polaridades diferentes e ordem crescente desta. Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila, acetato/metanol (7:3, v/v), acetato/metanol (1:1, v/v), e metanol, na ordem mencionada. Passou-se o solvente na coluna, até que o solvente passado saísse sem nenhuma coloração. A cada troca de solventes, a coluna foi seca com o auxílio de uma bomba de vácuo. O solvente resultante da coluna foi concentrado por destilação a pressão reduzida com auxílio de um rotaevaporador, obtendo assim as frações da raiz.

Este procedimento foi realizado com o extrato de caule de pequi.

3.6 - Germinação

Neste processo de germinação seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, na seção 3.2 e 3.2.1, mas foi realizado apenas nas concentrações de 0 e 200 ppm. O processo de coleta de dados também foi o mesmo descrito na seção 3.3.

3.7 – Preparação da coluna úmida

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.

3.8 – Obtenção das subfrações

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.

3.9 – Identificação 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 a presença de 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. Uma coloração que varia de amarelo a roxo sangue indica presença de 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.

Os métodos de preparação e reação destes reativos se encontra no apêndice, pág. 69.

3.10 – Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massas (CGEM).

As análises de espectrometria foram realizadas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC – 17A, equipado com uma coluna DB-5 (30 metros x 0,25 mm d.i.), apresentando uma temperatura inicial de 60 °C e razão de aquecimento de 3 °C/minuto até 240 °C por 20 minutos, com tempo total de corrida de 100 minutos. O injetor e interface apresentaram uma temperatura de 220 e 240 °C, respectivamente. Estava acoplado a um detector do tipo espectrômetro de massas de mesma marca, modelo GCMS – QP5000.

A espectrometria de massa foi feita com energia de impacto de 70 eV e foram coletados fragmentos de 40 a 650 Da. Para a identificação dos compostos foi usado uma biblioteca com aproximadamente 275.000 espectros de massa acoplada ao aparelho (Wiley 239) e índices de Kovat. Foram considerados apenas compostos com porcentagem média acima de 0,3 %. O volume injetado foi de 2,0 µL.

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da extração com metanol estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3: Massas e porcentagens dos extratos brutos de caule e raiz de pequi.

Extrato	Massa obtida	%
Caule	153,55g	3,07
Raiz	181,90g	3,64

Nota-se que uma pequena quantidade de massa foi obtida nos processos de extração do caule e raiz de pequi. Este baixo rendimento, segundo D'Almeida (1988), é comumente encontrado, uma vez que os metabólitos secundários são os menores constituintes em uma madeira. Na Tabela 4 se encontra a composição química da madeira (D'ALMEIDA, 1988), em geral, que justifica este resultado.

TABELA 4: Composição química da madeira.

Constituintes	%
Celulose	50
Hemiceluloses	20 – 30
Lignina	15 – 25
Metabólitos secundários	<10

A planta produz esta quantidade relativamente baixa de metabólitos secundários porque estes compostos são armazenados na própria planta que os produziu. Segundo Almeida (1988), as plantas devem mantê-los biologicamente inativos ou isolados em compartimentos celulares, impedindo a interferência destes compostos no seu metabolismo, pois estes compostos podem ser autotóxicos, ou seja, atuar contra a planta produtora, resultando em prejuízos para esta e/ou até mesmo na morte. Assim, quanto menor a quantidade produzida, mais fácil será este processo de inativação e armazenagem.

Quando as propriedades herbicidas dos extratos de raiz e caule de pequi foram testados, causaram reduções significativas na germinação e alongação da raiz e parte aérea da planta daninha monocotiledônea *Panicum maximum*, popularmente conhecida como capim-colonião. Os resultados destes bioensaios de germinação e desenvolvimento das sementes de *P. maximum* realizados na presença destes extratos estão apresentados nas Figuras 27 e 29, respectivamente.

Os resultados da Figura 27 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.

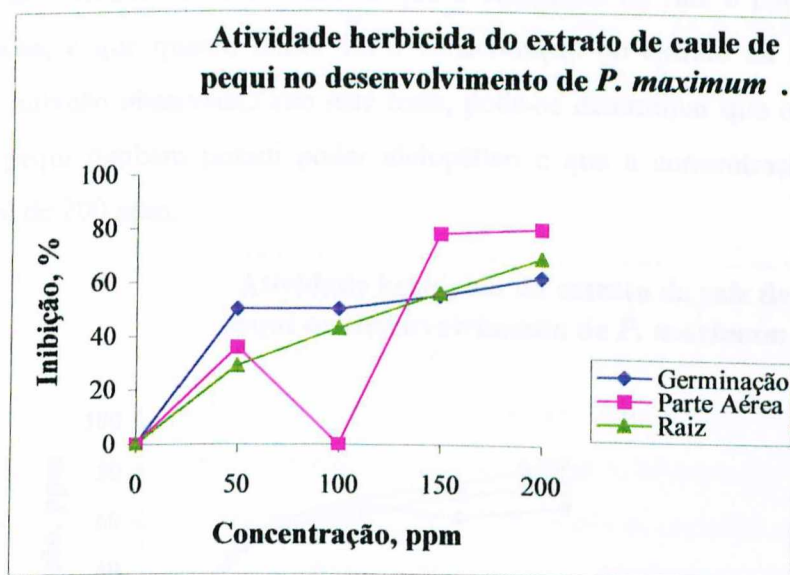


FIGURA 27: Efeitos da concentração do extrato metanólico de caule de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

A Figura 28 mostra uma comparação feita entre as plantas dos testes de germinação na presença do extrato metanólico de caule de pequi.

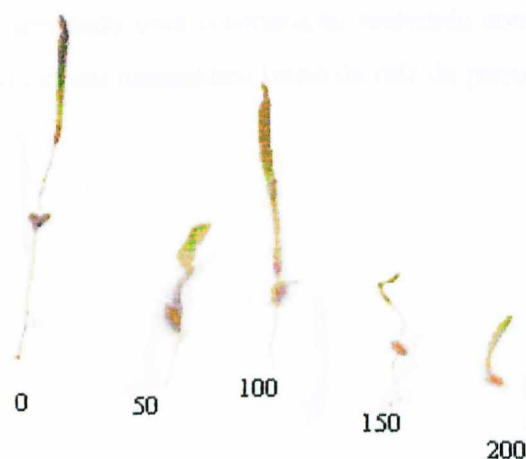


FIGURA 28: Comparação de plantas na presença do extrato de caule de pequi.

Os efeitos da concentração do extrato metanólico da raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum* são apresentados na Figura 29. 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.

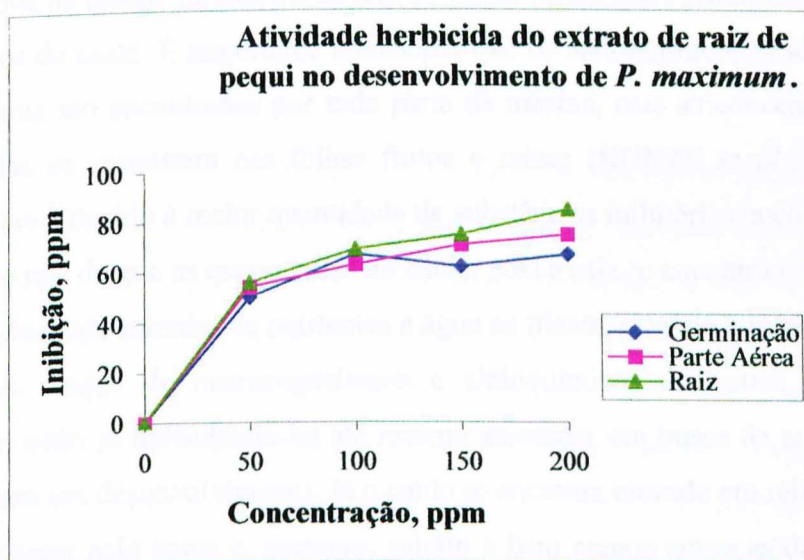


FIGURA 29: Efeitos da concentração do extrato metanólico da raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

A Figura 30 apresenta uma comparação realizada com as plantas do teste de germinação com o extrato metanólico bruto da raiz de pequi.

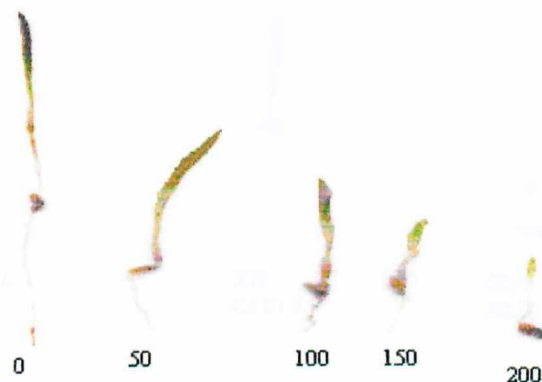


FIGURA 30: Comparação de plantas na presença do extrato de raiz de pequi.

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.

A Figura 31 mostra a comparação feita entre as plantas dos bioensaios do caule e raiz de pequi.



FIGURA 31: Resultado da comparação de plantas do branco, na presença do extrato de caule e raiz a 200 ppm.

Na sequência, fracionou-se os extratos metanólicos brutos, com solventes em escala crescente de polaridade. A Tabela 5 mostra os resultados deste fracionamento para o extrato de caule.

TABELA 5: Massas e percentagens das frações do extrato de caule de pequi.

Solvente	Massa fração	%
diclorometano	0,707	0,51
acetato de etila	2,3978	1,71
7-acetato: 3-metanol	12,8624	9,19
1-acetato: 1-metanol	21,9640	15,69
metanol	95,3523	68,1
Total	133,2835	95,2

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 95,2%. 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 32.

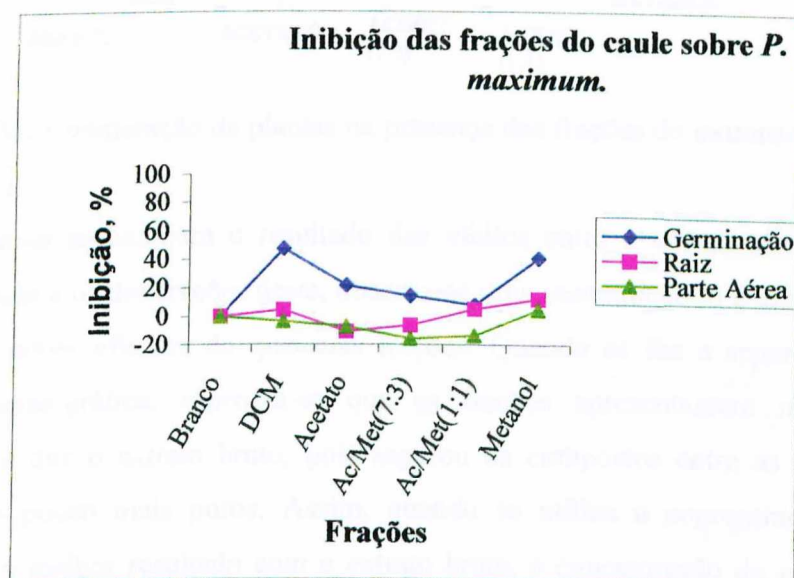


FIGURA 32: Efeitos das frações do extrato de caule de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Analisando a Figura 32, 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%. A Figura 33 mostra as plantas obtidas no teste de germinação com as frações do extrato metanólico bruto de caule de pequi.

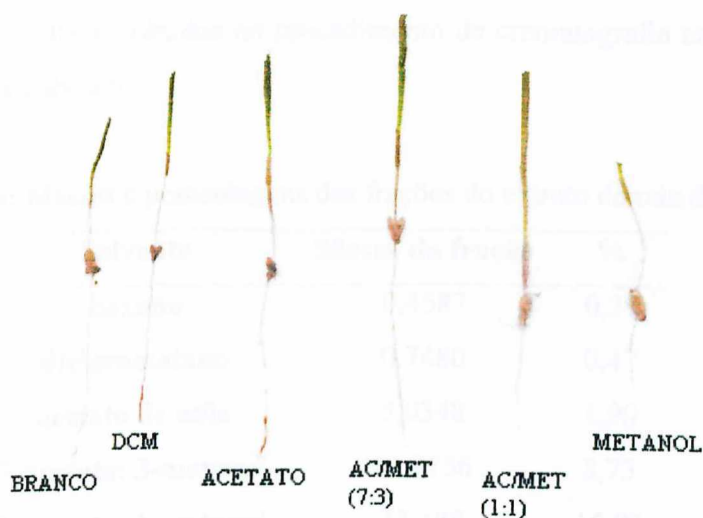


FIGURA 33: Comparação de plantas na presença das frações do extrato de caule de pequi.

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 aquela 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 um 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 6.

TABELA 6: Massas e porcentagens das frações do extrato de raiz de pequi.

Solvente	Massa da fração	%
hexano	0,4587	0,29
diclorometano	0,7480	0,47
acetato de etila	3,0348	1,90
7-acetato: 3-metanol	13,9756	8,73
1-acetato: 1-metanol	25,488	15,93
metanol	107,568	67,23
Total	151,2731	94,55

Com as frações obtidas, foram realizados novos testes de germinação. Os resultados destes testes estão apresentados na Figura 34.

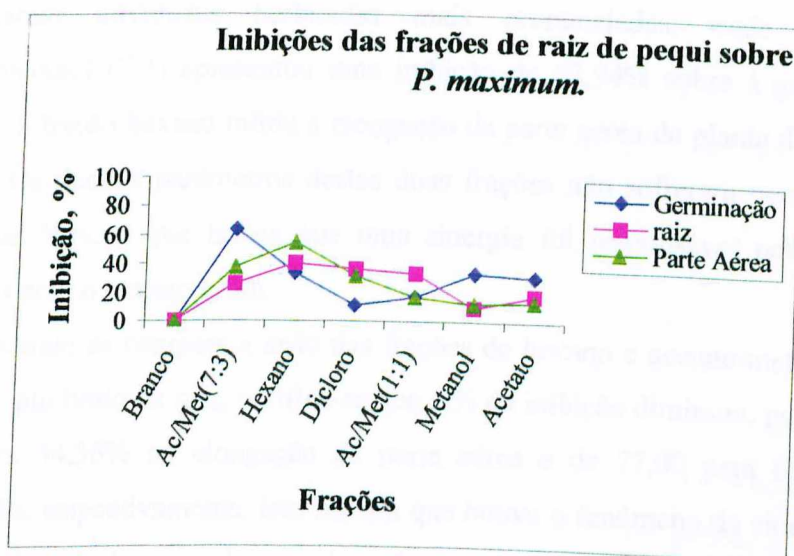


FIGURA 34: Efeitos das frações do extrato de raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

Observando-se a Figura 34, nota-se os resultados encontrados não foram tão bons quanto os encontrados com o extrato metanólico bruto de raiz. Novamente aconteceu o fenômeno de sinergia. As inibições observadas nestas frações estão relacionadas com a ação isolada de algum composto presentes 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. Através do teste de germinação, plantas foram coletadas e estão sendo mostradas na Figura 35.

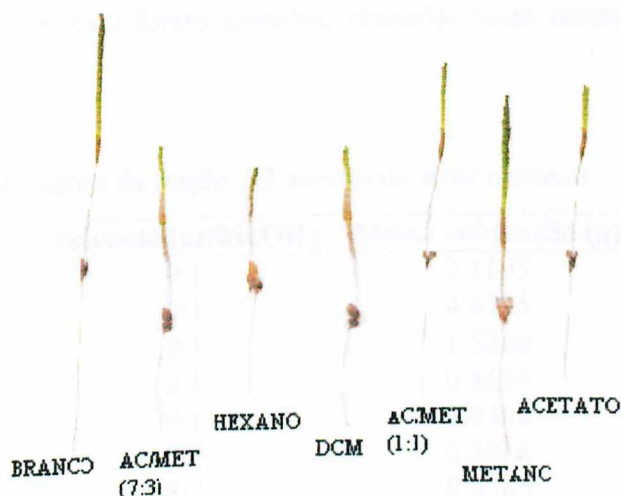


FIGURA 35: Comparação de plantas na presença das frações do extrato de raiz de pequi.

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, respectivamente. 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 sub-fracionamento 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 7. Durante o processo de separação na coluna, as subfrações foram colhidas em intervalo de 500 em 500 mL. Foram colhidas, ao todo, 23 subfrações, e as subfrações que apresentaram características semelhantes (testadas em

cromatografia de placas) foram juntadas, obtendo, deste modo, 13 subfrações, conforme Tabela 7.

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

Subfração	Solvente (ac/MeOH)	Massa subfração (g)	%
1	9:1	2.1193	16,30
2	9:1	4.4775	34,44
3	9:1	1.5260	11,74
4	9:1	0.8629	6,64
5	9:1	0.9380	7,22
6	8:2	0.5886	4,53
7	8:2	0.4585	3,53
8	7:3	0.1979	1,52
9	7:3	0.1264	0,97
10	7:3	0.0717	0,55
11	7:3	0.075	0,58
12	4:6	0.1724	1,33
13	2:8	0.0865	0,67
Total	x	11,7007	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, um 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 36.

Pela Figura 36 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 quando 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.

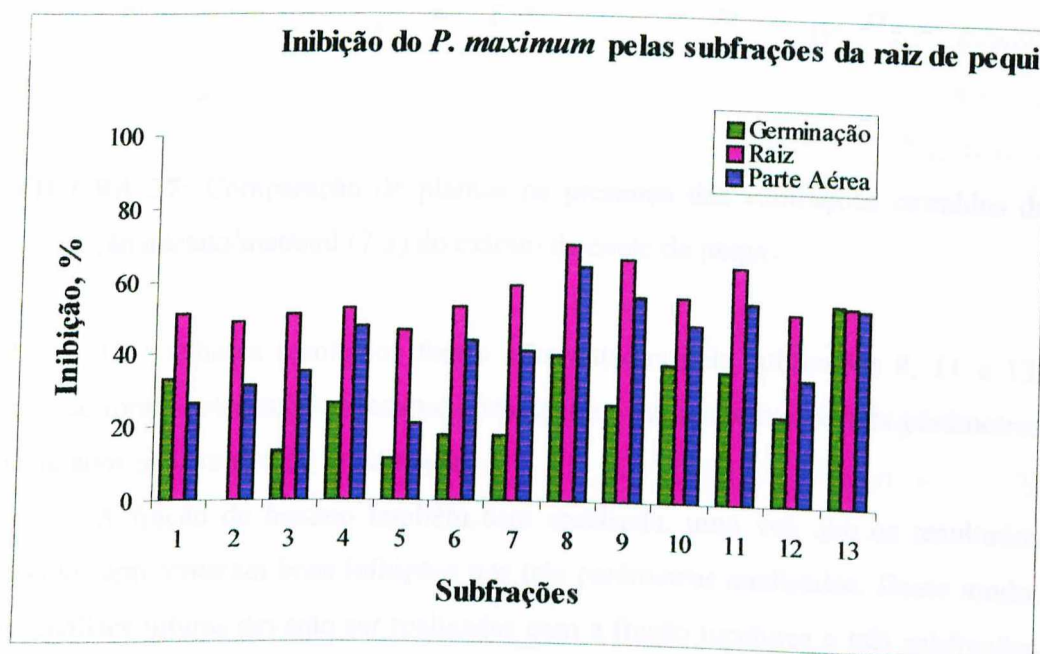


FIGURA 36: Efeitos das subfrações do extrato de raiz de *C. brasiliense* no desenvolvimento de sementes de *P. maximum*.

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).

A Figura 37 faz uma comparação entre plantas do teste de germinação realizado com as subfrações.

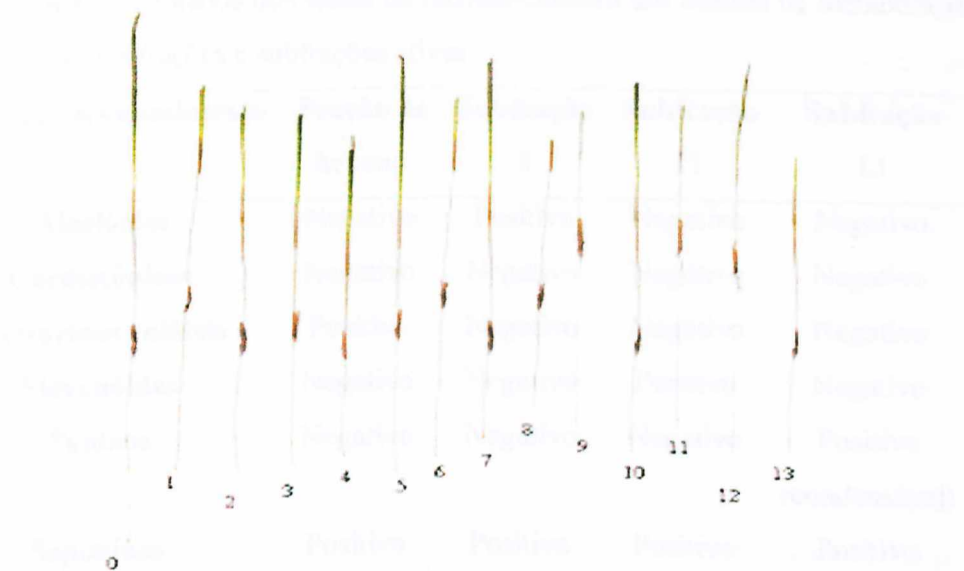


FIGURA 37: Comparação de plantas na presença das subfrações extraídas da fração acetato/metanol (7:3) do extrato de caule de pequi.

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 será analisada, uma vez que os resultados obtidos apresentaram 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 sequência, foram realizados testes de reconhecimento das classes de metabólitos secundários presentes na fração e subfrações selecionadas.

Os resultados destes ensaios estão dispostos na Tabela 8.

TABELA 8: Resultados dos testes de reconhecimento das classes de metabólitos secundários nas frações e subfrações ativas.

Teste de reconhecimento	Fração de hexano	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 Livres	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

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 (CORNMAN, 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 nutrição dos solos e Rice e Pancholy (1973) encontraram que taninos condensáveis são possivelmente importantes inibidores das bactérias

responsáveis pela nutrição 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 e ABUBAKIROV, 1996).

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

Na tentativa de identificar e elucidar os compostos voláteis, que também fazem parte dos metabólitos secundários, a fração hexânica e as subfrações 8, 11 e 13 foram analisadas por um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectro de massas.

A Figura 38 apresenta o cromatograma da fração hexânica.

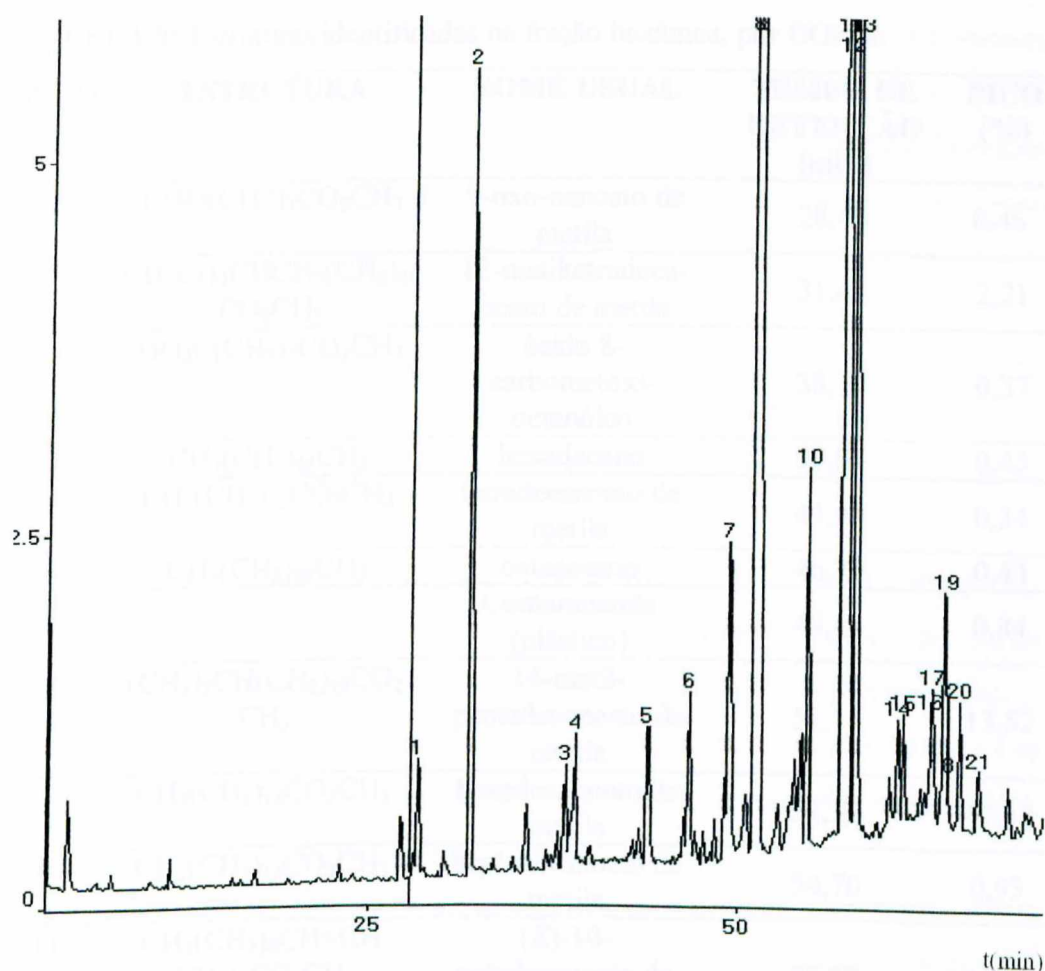


FIGURA 38: Cromatograma da fração de hexano.

Os sinais menores presentes no cromatograma não foram identificados, pois estão em concentrações muito baixas e muitas vezes, são constituídos de misturas de difícil elucidação.

A análise do cromatograma foi realizada por comparação com outros espectros de massas (por aproximação), contidos no aparelho, e também, por comparação com o índice de Kovat (calculado por $IK = 24,33TR + 673$, onde TR= tempo de retenção do composto no cromatógrafo gasoso), que prevê se uma estrutura está relativamente correta através da comparação com IK tabelados. Este índice só pode ser utilizado quando as condições de trabalho do aparelho foram idênticas às descritas no item 3.10.

A Tabela 9 mostra os resultados desta análise, indicando a estrutura, o nome usual, o tempo de retenção e a percentagem relativa de cada pico assinalado no cromatograma da Figura 38.

TABELA 9: Estruturas identificadas na fração hexânica, por CGEM.

PICO	ESTRUTURA	NOME USUAL	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	PICO (%)
1	$\text{CHO}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$	9-oxo-nanoato de metila	28,40	0,46
2	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{CH}_3$	12-metiltetradecanoato de metila	31,49	2,21
3	$\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$	ácido 8-carbometoxioctanóico	38,39	0,37
4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	hexadecano	39,04	0,45
5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{CH}_3$	tetradecanoato de metila	43,96	0,34
6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{CH}_3$	octacosano	46,79	0,43
7	—	Contaminante (plástico)	49,43	0,84
8	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{CH}_3$	14-metil-pentadecanoato de metila	51,13	13,52
9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{CH}_3$	hexadecanoato de metila	51,34	40,40
10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2\text{CH}_3$	heptadecanoato de metila	54,70	0,93
11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$	(E)-10-octadecenoato de metila	57,22	24,89
12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$	(Z)-10-octadecenoato de metila	57,37	2,42
13	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{CH}_3$	octadecanoato de metila	57,97	8,14
14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$	(E)-9-octadecenoato de metila	60,79	0,44
15	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}_2\text{CH}_3$	nonadecanoato de metila	61,14	0,46
16	—	mistura (não identificado)	62,93	0,54
17	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$	(Z)-9-octadecenoato de metila	63,10	0,70
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$	eicosano	63,74	0,33
19	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{CH}_3$	(Z ou E)-6-octadecenoato de metila	63,94	1,12
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3$	eicosanoato de metila	64,92	0,53
21	—	não identificado	66,16	0,49

Pode-se notar, pela Tabela 9, que os compostos identificados são alcanos, ácidos e ésteres de estruturas relativamente simples. Este resultado mostra que as inibições observadas causadas pela fração de hexano acontecem pela interação entre estes compostos mais as saponinas e cumarinas voláteis, ou seja, comprovando a teoria de que o fenômeno de sinergismo é o responsável pela atividade herbicida observada.

No pico 7 foi identificado um contaminante, de natureza plastificante. Provavelmente, este contaminante é o plástico do parafilme, usado durante os processos realizados para vedar tubos, placas de Petri e galões utilizados na preparação dos extratos brutos.

As subfrações 8, 11 e 13, também foram injetadas no cromatógrafo gasoso sob as mesmas condições. Porém, não foi possível realizar as análises, porque os cromatogramas obtidos apresentavam apenas a linha base gerada pelo solvente.

Como o cromatógrafo gasoso trabalha apenas com compostos voláteis e as subfrações 8, 11 e 13 foram extraídas por uma mistura de solventes mais polares, estas foram desprovidas de compostos voláteis.

O crescente uso de cromatografia gasosa acoplada com espectro de massa está tornando possível a identificação de muitos tipos de compostos de aleloquímicos. Geralmente, os compostos identificados são aqueles que são facilmente detectados pelos cromatógrafos. O conhecimento destes compostos é de grande importância na determinação dos métodos presentes nestas de escape para a natureza, quantidades presentes nesta, quantidades absorvidas pelos organismos afetados e métodos e índices de decomposição (RICE, 1984).

5 - CONCLUSÃO

Os extratos de caule e raiz de pequi apresentaram alelopatia sobre o desenvolvimento do *P. maximum* e que este efeito pode ser mais bem observado na concentração de 200 ppm. 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)) foram as que mostraram melhor alelopatia dentre as demais frações e subfrações obtidas. 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 análise cromatográfica da fração hexânica revelou a presença de 21 compostos, entre ácidos, ésteres e alcanos de estruturas simples, onde os compostos hexadecanoato de metila, (E)-10-octanoato de metila e 14-metilpentadecanoato de metila apresentaram-se em maior quantidade relativa, com percentagem de 40,40; 24,89 e 13,52%, respectivamente. três destes compostos não puderam ser identificados, por se tratarem de contaminantes ou misturas de compostos que dificultaram esta identificação. As subfrações 8, 11 e 13 não puderam ser analisadas, porque o cromatógrafo gasoso trabalha apenas com compostos voláteis, os quais não foram encontrados nas subfrações, devido ao fato de terem sido extraídas por uma mistura de solventes mais polares.

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, pois tiveram seus potenciais herbicidas reduzidos.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v. 20, n. 11, 1994.
- ALMEIDA, F.S. **A Alelopatia e as Plantas**. Londrina, PR, IAPAR (Instituto Agrônomo 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: CPAC, 1998.
- ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e Buriti- importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina, Embrapa - CPAC, 38p. (EMBRAPA – CPAC – Documentos, 54), 1994.
- ANDRADE, G. A.; CUNHA, M.C; LOURENÇATO, G.R.; REZENDE, D.M.L.C.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; LOTINA-HENNSSEN, B. Estudo do Potencial Alelopático de *Cenchrus echinatus* na Germinação de Plantas Monocotiledôneas e Dicotiledôneas. **Boletim Informativo – SBPCPD/Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**. – v.10, Suplemento (Maio, 2004). – São Paulo: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004 – Semestral.
- BACCHI, E.M. Alcalóides Tropânicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 657-678, 2000.
- BAGHESTANI, A.; LEMIEUX, C.; LEROUX, G.; BAZIRAMAKENGA, R. Determination of Allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. **Weed Science**, v.47, p. 498-507. 1999.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Tradução de Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. – 2ª edição - Porto Alegre: Bookman, 622 p., 2002. pág. 349.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; COSTA, C.G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Editora UFV, vol. 1, 2ª edição, 2004. págs. 324.

BOWYER, J. R.; CAMILLERI, P.; HUTSON, D. H. AND ROBERTS T. R. (Eds.) In: **Herbicides**. John Wiley & Sons: New York, v. 6, p.105-145. 1987.

CHIESA, F.A.F.; MOYNA, P. Alcalóides Esteroidales. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 707-722, 2000.

CHOU, C.H.; WALLER, G.R. Possible Allelopathic Constituents Of *Coffea arabica*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 6, nº 3, págs. 643-654, 1980.

COLEGATE, S.; MOLYNEUX, R. **Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination**. London: CRC press, 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 11, p.4807-48114. 1999.

D'ALMEIDA, M.L.O. **Composição Química dos Materiais Ligno Celulósicos, Celulose e Papel**. IPT, São Paulo, 46 p; 1988.

DUKE, S. O.; LYNDON, J. Natural phytotoxins as herbicides. In: **Pest control with enhanced environmental safety**. American Chem. Soc. p. 110-124, 1993.

DUKE, S.; DAYAN, F.; RIMANDO, A. Natural Products as Tools for Weed Management. Proceedings, **"Recent Topics of Weed Science. and Weed technology"**. Tokyo, April 13, 1998.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E; DUKE, M.V.; ABBAS, H.K. **Natural products as leads for new herbicide modes of action**. Brighton Crop Protection Conference – Weeds, p. 379-386, 1997a.

- DUKE, S.O.; SMEDA R.J.; WESTON, L.A. Potential for utilization of Allelopathy for Weed Management. XXI CBCPD, Caxambu – MG, p. 111-116, 1997b.
- FALKENBERG, M. de B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 545-570, 2000b.
- FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R.I. dos; SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 163-180, 2000a.
- FERREIRA, M. L.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; PERREIRA, R. C. Avaliação da atividade herbicida de algumas quinonas. *Acta Scientiarum*. V.22, p.999-1003. 2000.
- GEISSMAN, T. A.; CROUT, D.H. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. San Francisco: Freeman, Cooper & Company, 592p. 1969.
- GELMINI, G.A. **Herbicidas: indicações básicas**. Campinas, Fundação Cargill, 334 p., 1988.
- GOOD N. E.; TREBS, A., AVRON M. (Eds.) In: PIRSON, A.; ZIMMERMANN, M. N. **Encyclopedia of Plant Physiology. New Series**. General Editors. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. V. 5, p. 429-436. 1975.
- 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. *PNAS*, vol. 98, nº 23, págs. 13431-13436, 2001.
- HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A. MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.

Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 641-656, 2000.

HERNANDEZ-TERRONES, M. G.; AGUILAR, I.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN B. Interference of Methyl trachyloban-19-oate Ester with CF_0 of Spinach Chloroplasts H^+ -ATPase. **Arch. Biochemical Biology** , 418, p.93-97, 2003a.

HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; AGUILAR, I.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN, B. Inhibition of Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts by the Trachyloban-19-oic Acid. **Pest. Biochemistry and Physic.** V. 77, p.12-17, 2003b.

IKAN, R. **Natural products.** A laboratory guide. New York: Academic press, 360p. 1991

ISHAAYA, I. Biochemical processes related to insecticide action; an overview. In: **Biochemical sites of insecticide action and resistance.** New York: Springer, p. 1-16, 2000.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** Companhia Editora Nacional, São Paulo/SP, 12ª edição, 77 págs.,1998.

KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNANDEZ-TERRONES, M.; LOTINA-HENNSSEN, B. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. In: BERNAL-LUGO, I.; LOZA-TAVERA, H. **Avances en bioquímica y biología molecular de plantas.** México D. F.: UNAM, 198p, 2001.

KING-DIAZ, B.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G.; HERNANDEZ, P.; LOTINA-HENNSSEN, B. Interference of 14-deoxy colcon-v at OEC and ATPase level of spinach chloroplasts. In: **Third World Congress On Allelopathy.** Tskuba, Japan, 2002.

KOGAN, M.; PÉREZ, A. **Herbicidas: “Fundamentos Fisiológicos y Bioquímicos del modo de acción”.** Universidade Católica de Chile, 1ª edição, Ediciones, 333p, 2003.

- KUNZE, A.; AREGULLIN, M.; RODRÍGUEZ, E.; PROKSCH, P. Fate of chromone encecalin in the interaction of *Encelia farinosa* and its specialized herbivore *Trirhabda geminata*. **Journal Chemical Ecology**, vol. 22, págs. 491-498, 1996.
- KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 451-470, 2000.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Tradução de Carlos Henrique B. A. Prado. Revisão Técnica de Carlos Henrique B. A. Prado e Augusto César Franco. São Carlos, RiMa, 531 págs., 2000.
- LOPES, P.S.N.; SOUZA, J.C.de; REIS, P.R.; OLIVEIRA, J.M.; ROCHA, I.D.F. Caracterização do ataque da broca dos frutos do pequizeiro. **Revista Brasileira Frutic. Jaboticabal** – SP.Vol.25. n 3, p 540-543, dezembro, 2003.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa/ SP. 3ª edição Editora Plantarum, 339 p., 1990.
- LOTINA-HENNSSEN, B.; ESQUIVEL, B.; GONZALES-IBARRA, M.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G., Kerlinic acid as post-emergent photosynthetic herbicide inhibitor. In: **First European OECD Allelopathy SYMPOSIUM**. Vigo, Spain. Physiological Aspects of Allelopathy. v. 1, p. 178, 2001a.
- LOTINA-HENNSSEN, B.; ESQUIVEL, B.; MELO, G. S.; CORTE-SANDOVAL, E.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Potential herbicidal activity of compounds isolated from *Salvia officinalis* In: **Plant Biology** 2001. Providence, USA. Proceedings, v. 1, p. 137. 2001b.
- LOTINA-HENNSSEN, B.; MATA, R.; CALDERON, J.; CESPEDES, C.; JIMENEZ, M. Secondary metabolites isolated from Mexican plants: Target and

mechanism of action on photosynthesis. **Recent Res. Devel. In: Agricultural & Food Chem.**, v.2, p. 165, 1998.

MACÊDO, J. A. B. de. **Introdução à Química ambiental (Química & meio Ambiente & Sociedade)**. Juiz de Fora - MG, 1ª edição, 487 p., pág. 197. 2002.

MACIAS, F.; MOLINILLO, J.; GALINDO, J.; VARELA, R.; TORRES, A.; SIMONET, A. Terpenoids with potential use as natural herbicide templates. In: CUTLER, H.; CUTLER, S. **Biologically active natural products: Agrochemicals**. London: CRC Press. p.15-31, 1999.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.das G.; SOUZA, P.E. de; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A. de; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.de O. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciências agrotécnicas**, Lavras/MG. Edição especial, p 1410-1419, dezembro, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 126 p. 1988.

McCARTY, R. E.; TREBS, A.; AVRON, M. (Eds.). In: Pirson, A.; Zimmermann, M. H. **Encyclopedia of Plant Physiology. New Series** General Editors. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, v. 5, p. 437-447. 1975.

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

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P. de; ARAÚJO, E. de L.; AMORIM, E.L.C de. Taninos: Uma Abordagem Da Química à Ecologia. **Química Nova**, Vol.28, nº 5, págs. 892-896, 2005.

MOREIRA, F. de P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n.3, p.309-311. 2003.

- 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**, v.26, n.3, p.309-311. 2003.
- O'SULLIVAN, J.; BOUW, W.J. Reduced Rates of Post emergence Herbicides for Weed Control in Sweet Corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v 7, 4ª edição, p. 995-1000, 1993.
- PARVEZ, S.S.; PARVEZ, M.M.; NISHIHARA, E.; GEMMA, H.; FUJII, Y. *Tamarindus indica* L. leaf is a source of allelopathic substance. **Kluwer Academic Publishers**, vol. 40, págs. 107-115, 2003.
- PAULA, J.R. de; SALES, B.H.N.; SANTOS, S.C.; DE OLIVEIRA, C.M. A.; LIÃO, L.M.; FERRI, H.; FERREIRA, H.D. Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Caryocar Brasiliense* Camb. (Pequi). **Livro de resumos da 23ª Reunião Anual da SBQ**, vol 2, Poços de Caldas, 2000.
- PEIXOTO, A.R. **Plantas Oleaginosas Arbóreas**. Livraria Nobel S. A., São Paulo/SP, págs. 284, 1973.
- PINEIRO, L.; CORTEZ, D.A.G.; VIOLOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M.; FERREIRA, A.G. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae). **Química nova**. V. 26, n. 2. 2003.
- RATES, S.M.K. Heterosídeos Cardioativos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 571-596, 2000.
- 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**. V. 18, n.5, p. 577-608, 1999.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando, Flórida, EUA. 2ª edição, 422p, Academic Press Inc, 421 págs, 1984.

SAAD, O. **A vez dos herbicidas**. Nobel/ SP. 2ª edição, 2ª impressão. Livraria Nobel, 267 p.,1985.

SANTOS, R.I. dos. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 323-354, 2000a.

SANTOS, S. da C.; MELLO, J.C.P. de. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 517-544, 2000b.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 597-622, 2000.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides Indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 679-706, 2000.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC. 822p, 2000a.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição

rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 387-416, 2000b.

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**. V.7, n.1, p. 180-197, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução: SANTARÉM, E. R.; MARIATH, E. de A.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L. de. 3ª edição – Porto Alegre, RS – Artmed, 720 págs., 2004.

TIMBEKOVA, A.E.; ISAEV, M.I.; ABUBAKIROV, N.K. Chemistry and Biological Activity of triterpenoid glycosides from *Medicago sativa*. **Saponins Used in food and Agriculture**, Plenum Press, New York, págs. 171-182, 1996.

WRIGHT, K.; PILLMOR, J.B.; BRIGGS, G.G. Rationality in herbicide design. In: BAKER, N.R.; PERCIVAL, M.P. **Herbicides**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., v 10, p. 337-364, 1991.

ZIMDHAL, R. L. **Fundamentals of weed science**. New York: Academic Press, 1999. 556p.

ZUANAZZI, J.A. da S. Flavonóide. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: das Plantas ao Medicamento**. 2ª edição rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 489-516, 2000.

7 - 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 HgCl_2 / 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 Bornträger:** 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 a 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.