

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS EM SEMENTES DE *Annona crassiflora*

SANTANA; D.C.¹, INOUE; M.H.², VILHENA; K.S.S.³, SOUZA FILHO; A.P.S.⁴, POSSAMAI; A.C.S.⁵, PEREIRA; K.M.⁶

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP; (14) 96946880; diogopd@gmail.com

² Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra-MT; miriamhinoue@hotmail.com

³ Universidade Federal do Pará, Belém-PA; karyufpa@yahoo.com.br

⁴ Laboratório de Agroindústria, Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA; apedro@cpatu.embrapa.br

⁵ Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana-MS; anacassiapossamai@hotmail.com

⁶ Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra-MT; schinkiler@gmail.com

Resumo

O estudo visou identificar substâncias biologicamente ativas e o potencial alelopático de esteróides glicosilados, provenientes das sementes de *Annona crassiflora*. O isolamento dos esteróides glicosilados foi realizado com a separação dos constituintes químicos do extrato bruto de acetato de etila em coluna cromatográfica, sendo a completa elucidação estrutural por meio de espectroscopia de RMN ¹H. Testes de germinação com as espécies *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* foram conduzidos em câmaras tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, monitorados durante 10 dias com avaliação diária nas concentrações de 0, 20, 40, 80 e 100 mg L⁻¹ dos materiais isolados. Utilizando as mesmas concentrações, os experimentos de desenvolvimento de radícula e hipocótilo foram mantidos em câmara de germinação a 25 °C com fotoperíodo de 24 horas, com avaliação no décimo dia. Após o extrato de acetato de etila ser submetido ao fracionamento, verificou-se a presença de sinais característicos de fitoesteróis no espectro do RMN ¹H, resultando em uma mistura de estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado. Os resultados indicam que as substâncias estigmasterol e sitosterol não proporcionaram inibição na germinação e no índice de velocidade de germinação (IVG) de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*. Por outro lado, estigmasterol e sitosterol interferiram no desenvolvimento de radícula e hipocótilo de *E. heterophylla*.

Palavra chave: estigmasterol, sitosterol, germinação, desenvolvimento.

Abstract

The work was aimed to identify substances and the allelopathic potential of steroidal glycosides, isolated from the seeds of *Annona crassiflora*. Isolation of steroidal glycosides was carried out with the separation of chemical components of the extract of ethyl acetate in the chromatographic column and identified by ¹H NMR. Germination tests with *Euphorbia heterophylla* and *Ipomoea grandifolia* were carried out in BOD Germinator at 25 °C and photoperiod of 12 hours, monitored for 10 days at concentrations of 0, 20, 40, 80 e 100 mg L⁻¹ of the materials isolated. With the same concentrations, the experimental development of radicle and hypocotyl were maintained at 25 °C with photoperiod of 24 hours for 10 days. After the extract of ethyl acetate to be submitted to the division, it was the presence of characteristic signs of steroids in the ¹H NMR spectrum, providing a mixture of stigmasterol and sitosterol glycoside. The results indicate that substances stigmasterol and sitosterol did not produce inhibition of germination and speed of germination velocity index (SIG) of *E. heterophylla* and *I. grandifolia*. Moreover, stigmasterol and sitosterol affected the development of radicle and hypocotyl of *E. heterophylla*.

Key words: stigmasterol, sitosterol, germination, development.

Introdução

O ecossistema de cerrado, que é considerada a mais rica biodiversidade de todas as savanas do mundo, porém necessita de mais estudos para compreender a grande fonte de substâncias que este bioma pode fornecer (Costa et al., 2008), uma vez que entre os inúmeros compostos produzidos por sua flora alguns podem ser úteis para o manejo de plantas daninhas.

Com desafio de constituir um controle efetivo das plantas daninhas, que se enquadrem nas exigências da preservação e qualidade dos recursos naturais (Souza Filho et al., 2005a), o isolamento de substâncias alelopáticas, e sua identificação, proporciona grande avanço no fornecimento de alternativas sustentáveis no controle de plantas daninhas em áreas agrícolas do cerrado. Nesse sentido, plantas da família Annonaceae podem ser uma ótima alternativa para produzirem efeitos alelopáticos, por apresentarem atividades de herbicidas sobre diversas plantas daninhas (Inoue et al., 2009).

Estudo fitoquímico realizado por Gonçalves et al. (2009) com a madeira de *Annona crassiflora* resultou na obtenção de dois alcalóides: aterospermidina e liriodenina, que possuem diversas atividades biológicas. Por exemplo, antimicrobiana e tripanosomicida no caso da liriodenina, já o alcalóide aterospermidina possui atividade contra células de hepatoma humano. Do mesmo modo, ao avaliar o extrato bruto preparado com sementes de *A. crassiflora*, Santana et al. (2009) verificaram que determinadas substâncias naturais interferiram na germinação e desenvolvimento de *Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*. Relatos disponíveis em literatura fazem com que este gênero se destaque pelas diversas classes estruturais encontradas, tais como alcalóides, amidas, ditrepenos, esteróides, flavonóides e acetogeninas (Pontes et al., 2004), úteis na produção de bio defensivos.

Diante da necessidade de estudos que visem isolar, identificar e, posteriormente manipular moléculas com propriedades alelopáticas, o trabalho objetivou isolar e identificar substâncias biologicamente ativas das sementes de *A. crassiflora*, bem como avaliar o potencial alelopático dessas substâncias sobre a germinação e desenvolvimento de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*.

Material e Métodos

Sementes de *A. crassiflora* foram coletadas em área de Cerrado, no município de Nova Marilândia, MT. O isolamento e a identificação das substâncias presentes nas sementes de *A. crassiflora* foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém, PA. Os demais procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra, MT.

O isolamento dos esteróides glicosilados presentes nas sementes de *A. crassiflora*, foi realizado com a separação de componentes químicos do extrato bruto acetato de etila das sementes de *A. crassiflora* por Cromatografia de Coluna por Via Úmida (CCVU), chamada de "R1" (Figura 1).

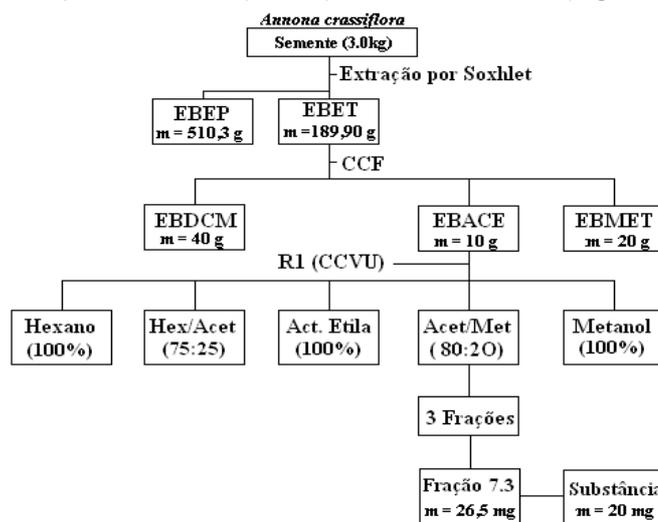


Figura 1. Representação esquemática do processo de isolamento e purificação das substâncias presentes no extrato bruto de acetato de etila (EBACE), preparado com sementes de *A. crassiflora*.

Após ser concentrada à temperatura ambiente, cada amostra da CCVU foi solubilizada com pequena quantidade de solvente conforme a polaridade da mesma. Em seguida, com ajuda de capilares, esse material foi aplicado em placas de Cromatografia de Camada Delgada - CCD (ALUMINUM BACKED TLC, SÍLICA GEL, HARD LAYER, F-254, SAI). As placas de CCD foram ativadas em estufa com temperatura de 100 °C durante 1 hora. As placas foram eluídas em sistemas de solventes em polaridade crescente, em seguida reveladas com Sulfato Cérico [Ce (SO₄)₂.H₂O] e queimadas em estufa a 100 °C.

As placas reveladas foram comparadas e aquelas consideradas semelhantes reunidas em uma amostra somente para identificação. A fração 7.3 revelada na CCD com acetato de etila/metanol (80:20) (sólido branco de massa igual a 26,5 mg) foi analisada por meio de RMN ¹H e identificada como uma mistura dos esteróides glicosilados (estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado).

Os bioensaios de germinação e desenvolvimento foram realizados com o estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado, obtidos no extrato da fração 7.3. Os testes de germinação foram conduzidos em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, previamente limpas com álcool 70%, forradas com duas folhas de papel-filtro esterilizadas em autoclave a temperatura de 127 °C e 1 atm. Cada placa recebeu 3,0 mL de extrato da fração 7.3 diluída em metanol nas concentrações de 0, 20, 40, 80 e 100 mg L⁻¹. Após a evaporação do solvente presente no extrato em temperatura ambiente, 25 sementes de das espécies *E.*

heterophylla ou *I. grandifolia* foram distribuídas dentro de cada placa. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação (BOD) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, monitorada durante 10 dias com avaliação diária. Desta maneira considerou semente germinada aquela que a radícula apresentou 2 mm de comprimento, eliminando-a em seguida. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido conjuntamente com os testes de germinação, conforme estabelecido por Maguire (1962).

Os experimentos de desenvolvimento de radícula e hipocótilo de *E. heterophylla* e *I. grandifolia* foram conduzidos avaliando as mesmas concentrações do teste de germinação, também em placas de Petri. Foram acondicionadas três sementes pré-germinadas com 2 mm de comprimento e mantidas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 24 horas, com avaliação no décimo dia após a montagem do experimento, medindo o comprimento da radícula e do hipocótilo. Todos os tratamentos receberam em cada placa igual volume de água destilada mantendo o volume inicial de 3,0 mL, assim como o tratamento de 0 mg L⁻¹ (testemunha).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (SAEG, 1997).

Resultados e Discussão

O extrato acetato de etila após ser submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna via úmida (CCVU) forneceu uma mistura das substâncias estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado (Figura 2). Similarmente a este estudo, Chaves (1997) verificou a presença da mistura de estigmasterol e sitosterol em *A. squamosa*, comprovando a presença destas substâncias também nessa espécie da família das Annonaceae.

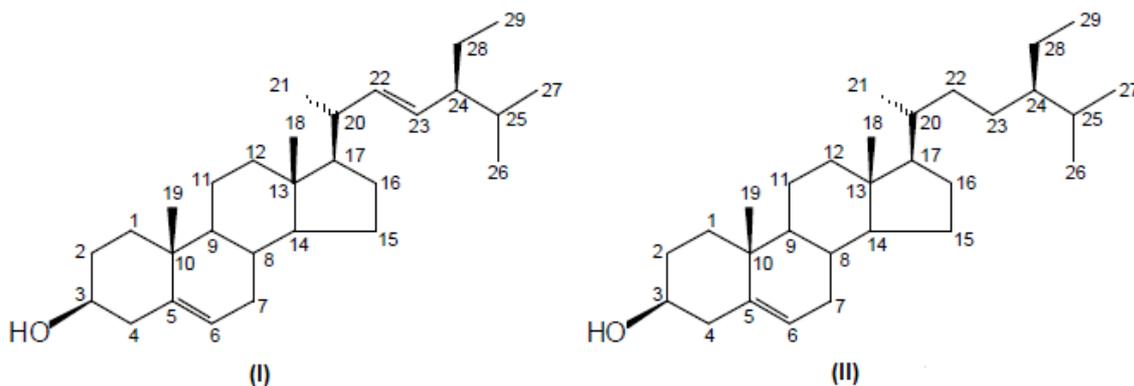


Figura 2. Substâncias isoladas do extrato bruto de acetato de etila de *A. crassiflora*. São os esteróides glicosilados: estigmasterol glicosilado (I) e sitosterol glicosilado (II).

No espectro do RMN ¹H se verificou sinais característicos de hidrogênios de esteróide. Observou um singlete largo em δ_H 5,34 relativo ao hidrogênio (H-6) ligado ao carbono olefínico C-6 de um esteróide; dois duplos dupletos, um em aproximadamente δ_H 5,07 e outro em aproximadamente δ_H 5,14 característicos de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos (C-22 e C-23) da ligação dupla presente na cadeia lateral do estigmasterol, um multipletto em δ_H 3,47-3,55 correspondente a hidrogênio ligado a carbono oximetínico C-3, além dos demais sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos.

A identificação do sitosterol pode ser justificada pela forte intensidade dos sinais nas regiões das metilas em δ_H 0,66 e entre δ_H 0,92-0,84. Além dos deslocamentos anteriormente citados, relativos às estruturas do estigmasterol e do sitosterol, são observados ainda sinais que caracterizam a presença de uma unidade de carboidrato. Observam-se um dupletto largo em δ_H 4,58 ($J= 12,3$ Hz) e um duplo dupletto em δ_H 4,42 ($J= 12,0$ e 6,0) atribuídos a H-6'a e H-6'b, respectivamente. Verificam-se um multipletto sobreposto em δ_H 4,3-4,2 e outro em δ_H 4,0-3,9 relativos aos hidrogênios H-1', H-2', H-3', H-4' e H-5'. Os sinais que foram mencionados acima podem ser observados no espectro de RMN ¹H obtido da fração 7.3, conforme analisado em literatura (Hung & Yen, 2001; Falcão, 2003).

Nos bioensaios com esteróides glicosilados (fração 7.3), verificou-se que essas substâncias não proporcionaram inibição na germinação e no IVG de *E. heterophylla* e *I. grandifolia* (Tabela 1). Tal fato indica que a fração de esteróides glicosilados não provocou nenhuma redução na germinação em relação à testemunha, evidenciando não ter ocorrido efeito alelopático sobre as espécies avaliadas no que se refere à germinação. Provavelmente, estes aleloquímicos apresentam diferentes efeitos alelopáticos em relação à

fase em que se encontra a planta testada. Resultados semelhantes foram obtidos por Alves et al. (2003), quando testaram o efeito alelopático de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* sobre a germinação de alface nas concentrações de 0, 100, 200, 400 e 800 mg L⁻¹, sendo observado que as substâncias não proporcionaram interferência na germinação de alface, independente da concentração utilizada.

Tabela 1. Efeito de esteróides glicosilados provenientes das sementes de *A. crassiflora* sobre a germinação e IVG de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*.

Conc. mg L ⁻¹	Germinação (%)		IVG (%)	
	<i>E. heterophylla</i>	<i>I. grandifolia</i>	<i>E. heterophylla</i>	<i>I. grandifolia</i>
0	16 Aa	29 Aa	4,0 Bb	10,4 Aa
20	26 Aa	36 Aa	8,1 Aa	11,3 Aa
40	17 Aa	27 Aa	5,0 Bb	10,8 Aa
80	17 Ab	32 Aa	4,0 Bb	12,3 Aa
100	28 Aa	38 Aa	8,9 Ab	14,6 Aa
C.V.(%)	35,6		35,2	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora a variação no efeito alelopático possa estar associada aos fatores de concentração na substância analisada (Souza Filho et al., 2005a), não houve diferença significativa dentro do intervalo de concentrações avaliadas (20 a 100 mg L⁻¹) nos bioensaios de desenvolvimento de *E. heterophylla* e *I. grandifolia* (Tabela 2). Portanto, a concentração de aleloquímicos presentes nas concentrações estudadas também não foi capaz de afetar o desenvolvimento de radícula e hipocótilo de *I. grandifolia*, em relação à testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de esteróides glicosilados provenientes das sementes de *A. crassiflora* sobre o desenvolvimento de radícula e hipocótilo de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*.

Conc. mg L ⁻¹	Radícula (cm)		Hipocótilo (cm)	
	<i>E. heterophylla</i>	<i>I. grandifolia</i>	<i>E. heterophylla</i>	<i>I. grandifolia</i>
0	1,3 Aa	1,7 Aa	1,7 Aa	2,0 Aa
20	0,2 Ba	0,7 Aa	0,1 Ba	1,2 Aa
40	0,4 Ba	1,2 Aa	0,6 Ba	0,7 Aa
80	0,3 Bb	1,2 Aa	0,1 Bb	1,6 Aa
100	0,4 Ba	0,8 Aa	0,2 Ba	1,2 Aa
C.V.(%)	21,7		28,2	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Por outro lado, todas as concentrações de esteróides glicosilados afetaram tanto o desenvolvimento de radícula, como o hipocótilo de *E. heterophylla* (Tabela 2), evidenciando a sensibilidade no desenvolvimento desta espécie às substâncias avaliadas. Este resultado indica o efeito alelopático de estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado sobre a espécie testada, ressaltando que o desenvolvimento de *E. heterophylla* foi a fase mais sensível aos aleloquímicos testados, ao contrário da germinação (Tabela 1). Da mesma forma, em comparação à germinação das sementes, dados obtidos por Souza Filho et al. (2005b) indicaram que o crescimento da radícula foi o parâmetro mais sensível aos efeitos da substância 4,5-diidrobulmenol A. Virtuoso (2008), ao avaliar a fração das cascas de *Erythrina velutina*, em que foram isolados compostos de estigmasterol e sitosterol, observou que essas substâncias foram capazes de inviabilizar o pleno desenvolvimento de *Lactuca sativa*, comprovando o efeito alelopático destes aleloquímicos.

Os resultados obtidos indicam que as substâncias estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado, isoladas no extrato bruto de acetato de etila de sementes de *A. crassiflora*, reduziram o desenvolvimento de radícula e hipocótilo da espécie *E. heterophylla*, evidenciando efeito alelopático sobre essa planta daninha.

Literatura Citada

ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G.; NETO, J.J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 93-97, 2003.

CHAVES, M.H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Quím. Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.

COSTA, J.V.M.; SILVA, M.S.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.S.; ESPINDOLA, L.S.; SILVA, E.M.; PAULA, J.E.; LIMA, T.R.; VIEIRA, E.A.; ANJOS, J.R.N. Raízes de plantas nativas do cerrado, gêneros *Matayba* e *Serjania*, da família do guaraná (Sapindaceae), apresentam princípios ativos contra o fungo causador da brusone em trigo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CERRADO, 9 /SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Cerrado, [2008]. CD-ROM.

FALCÃO, D.Q. **Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2003, 148p.

GONÇALVES, M.A.; LARA, T.A.; PIMENTA L.P.S. Alcalóides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, [2009]. CD-ROM.

HUNG, C.Y.; YEN, G.C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsiansao (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensm Wiss Technology**, v.34, p.306-11, 2001.

INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; PEREIRA, M.J.B.; POSSAMAI, A.C.S.; AZEVEDO, V.H. Extratos aquosos de *Xylopiia aromatica* e *Annona crassiflora* sobre capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e soja. **Sci. Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 245-250, 2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selectionevaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Sci.**, v. 2, p. 176-199, 1962.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P.J.M. Flora paraibana: Annonaceas Juss. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**: versão 7.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997.

SANTANA, D.C.; INOUE, M.H.; PEREIRA, M.J.B.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; PEREIRA, K.M.; SILVA, B.A.S. Reação do extrato bruto de acetato de etila da *Annona crassiflora* sobre espécies de plantas daninhas. In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, 4., 2009, Cuiabá. **Anais...** Itajaí: Rede Iberoamericana de Estudo e Aproveitamento Sustentável da Biodiversidade Regional de Interesse Farmacêutico, [2009]. CD-ROM.

SOUZA FILHO, A.P.S.; FONSECA, M.L.; ARRUDA, M.S.P. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 565-573, 2005a.

SOUZA FILHO, A.P.S.; LOBO,L.T.; ARRUDA, M.S.P. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla* (Leg. - Pap.). **Planta Daninha**, v.23, n.4, p. 557-564, 2005b.

VIRTUOSO, S. **Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. - Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae)**. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008, 111p.