

# PROSPECÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Senna alata* COM ATIVIDADE ALELOPÁTICA<sup>1</sup>

*Chemical Prospecting of Compounds Produced by Senna alata with Allelopathic Activity*

RODRIGUES, I.M.C.<sup>2</sup>, SOUZA FILHO, A.P.S.<sup>3</sup>, FERREIRA, F.A.<sup>4</sup> e DEMUNER, A.J.<sup>5</sup>

RESUMO - *Senna alata* é uma espécie daninha frequente em pastagens da região amazônica. Suas folhas apresentam propriedades medicinais capazes de influenciar a germinação e o desenvolvimento de outras plantas. Objetivou-se neste estudo a prospecção química e a avaliação da atividade alelopática dos compostos presentes nas folhas de *S. alata*. O material vegetal foi seco, triturado e submetido à extração exaustiva, com solução água:metanol (3:7). O extrato obtido foi então fracionado por coluna cromatográfica por via úmida. As frações mais puras foram submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, para determinação das fórmulas estruturais das moléculas. Na avaliação dos efeitos das substâncias químicas isoladas, utilizaram-se as concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm, tendo como eluente solução hidrometanólica (3:7 v/v). As frações foram adicionadas em placas de Petri e seus efeitos avaliados sobre a germinação de sementes e o alongamento da radícula e hipocótilo de três espécies daninhas de áreas de pastagens: *Mimosa pudica*, *Senna obtusifolia* e a própria *S. alata*. Os compostos com atividade alelopática encontrados em folhas de *S. alata* pertencem à classe dos flavonoides glicosilados, cujo núcleo aromático é um kaempferol, e causaram maior inibição sobre o crescimento da radícula e sobre a germinação de *S. obtusifolia* e *M. pudica*. Já os efeitos autotóxicos desse composto são pouco significativos para o desenvolvimento da plântula e nulos sobre a germinação.

**Palavras-chave:** Leguminosae, aleloquímicos, RMN, flavonoides glicosilados, kaempferol.

**ABSTRACT -** *Senna alata* is a weed species frequently found in pastures of the Amazonian region and whose leaves have medicinal properties. This study aimed to carry out a chemical prospecting and evaluation of the allelopathic activity of the compounds present in *S. alata* leaves. The plant material was dried, ground, and submitted to exhaustive extraction with water/methanol (3:7) solution. The crude extract obtained was fractionated by wet chromatography column. The purest fractions were submitted to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to determine their structures. To evaluate the effects of the isolated chemical substances, concentrations of 50, 100, 150 and 200 ppm were used in water/methanol solvents (3:7). The fractions were placed on Petri dishes and their effects were evaluated on seed germination and radicle and hypocotyl elongation of three pasture weeds: *Mimosa pudica*, *Senna obtusifolia*, and *Senna alata* itself. The compounds with allelopathic activity found in *S. alata* leaves belong to the flavonoid glycoside class, whose aromatic core is a kaempferol causing major inhibition on radicle elongation and germination of *S. obtusifolia* and *M. pudica*. The auto toxic effects of this compound are not very significant for seedling development and null for germination.

**Keywords:** Leguminosae, allelochemicals, NMR, flavonoid glycosides, kaempferol.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 18.2.2009 e na forma revisada em 12.3.2010 .

Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora.

<sup>2</sup> Bióloga, Pós-Graduação, Dep.de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – DFT/UFV, 36570-000 Viçosa-MG, Brasil, Bolsista CNPq, <izabellamcr@yahoo.com.br>; <sup>3</sup> Eng<sup>a</sup>-Agr<sup>a</sup>, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, S/N, 66095-100 Belém-PA; <sup>4</sup> Professor Titular, DFT/UFV; <sup>5</sup> Professor do Dep. de Química – DPQ/UFV.



## INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como mata-pasto, *Senna alata* é uma espécie daninha que infesta pastagens cultivadas da região amazônica, constituindo-se em um problema de ordem bioeconômica a limitar o desempenho produtivo e a rentabilidade da atividade agrícola. É uma planta perene, arbustiva e, em observação do desenvolvimento em campo de indivíduos dessa espécie, verificou-se que apresentam crescimento vegetativo extremamente rápido, com tendência à formação de estandes puros. Esta característica pode ser uma evidência de dois fenômenos: alelospolia e alelopatia. A espécie é medianamente frequente em áreas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, em quase todo o Brasil, principalmente em lugares úmidos (Lorenzi, 2000). *S. alata* pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, provavelmente nativa do norte da América do Sul; foi naturalizada e cultivada desde os Estados Unidos até a Argentina (Irwin & Barneby, 1982).

As espécies de *Senna* eram incluídas no gênero *Cassia sensu lato* até o tratamento taxonômico de Irwin & Barneby (1981), quando esses gêneros foram separados. Trabalhos recentes baseados em morfologia floral têm confirmado essa divisão (Boonkerd et al., 2005). O gênero *Cassia sensu lato* possui um longo histórico de importância econômica, sobretudo como plantas medicinais (Boonkerd et al., 2005).

A espécie *Senna alata* apresenta propriedades terapêuticas; na Índia, todas as partes da planta são utilizadas nos sistemas de medicina ayurvedica, unani e alopatia (Damodaran & Venkataraman, 1994). Em muitos países, suas folhas, cascas, flores e raízes podem ser utilizadas na medicina popular por suas propriedades anti-herpética, antifebrífuga, antianêmica, antiblenorrágica, antinefrítica, antidota, antimicótica, diurética, parasiticida, laxante e contra doenças de pele (Awal et al., 2004; Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Pieme et al., 2006; Plantamed, 2007). Na África, é plantada nos arredores das casas para espantar formigas (Barrese Pérez et al., 2005). O estudo de Agbagwa et al. (2003) demonstrou os efeitos

alelopáticos do extrato bruto de *S. alata*, que induziu um decréscimo consistente no percentual absoluto e na taxa de germinação, além de inibir o crescimento da radícula em *Celosia argentea*.

Na natureza existem milhares de compostos bioativos com propriedades inexploradas. Muitos deles são metabólitos secundários gerados por plantas como resultados de uma coevolução, que frequentemente geram efeitos em outros organismos e, em muitos casos, possuem a função de compostos bioquímicos de defesa ou aleloquímicos. Dessa maneira, numerosas plantas vêm sendo usadas, principalmente no meio rural, como remédios, repelentes de insetos, venenos usados na pesca, entre outras finalidades (Chom & Kim, 2004; Souza-Filho, 2006).

Os relatos populares, ao lado de plantas conhecidas como tóxicas para o homem e animais, podem fornecer excelentes pistas para o estudo químico de produtos naturais, além de dados da literatura sobre ações antioxidantes, anti-inflamatórias e inseticidas dos vegetais.

A química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, por meio de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Esses compostos podem ser de interesse acadêmico, não registrados na literatura especializada, intermediários de processos de biossíntese, ou de importância quimiotaxonômica, e, algumas vezes, substâncias de interesse econômico, como novos agentes medicamentosos ou novas fontes de compostos raros já utilizados (Matos, 1997). A prospecção permite ao químico o conhecimento preliminar do comportamento químico dos extratos com o qual se deverá trabalhar, sendo um instrumento utilizado na seleção de plantas para estudo. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a prospecção dessas substâncias, e o seu planejamento deve ser feito de acordo com objetivos específicos. Já a determinação da estrutura molecular dos constituintes isolados consiste em um campo especializado da química orgânica e é feita principalmente pela interpretação de vários espectros obtidos em espectrômetros de absorção das radiações ultravioleta, visível e infravermelha, espectrômetro de ressonância

magnética protônica e de carbono 13, espectrômetro de massas, entre outros (Matos, 1997).

O potencial para o uso de produtos naturais de plantas como herbicidas é grande, sobretudo na agricultura agroecológica, seja para o uso direto ou como base para a síntese de novas moléculas herbicidas, uma vez que, embora o método de controle químico seja prático, possui uma série de limitações. O uso de herbicidas sintéticos, algumas vezes, leva à poluição ambiental, além de causar efeitos inerentes, como resistência, entre outros (Duke et al., 2000; Hachinohe & Matsumoto, 2007).

Entre os constituintes químicos até então identificados em *Senna alata* estão presentes taninos, triterpenos, esteroides, alcaloides, carboidratos redutores, flavonoides, saponinas, cumarinas, antocianidinas, emodina, antraquinona, chrysarabina, ribarina, ácido málico, ácido tartárico, ácido crisofânico e um óleo essencial (Ordoñez et al., 2004; Barrese Pérez et al., 2005; Plantamed, 2007).

Objetivou-se, neste estudo, o isolamento e a identificação de substâncias químicas encontradas em folhas da espécie *Senna alata*, bem como a caracterização de sua capacidade alelopática inibitória sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de três espécies daninhas encontradas em áreas de pastagens cultivadas da região amazônica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e processamento de material vegetal

A espécie *Senna alata* foi plantada em fevereiro de 2006 no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. A coleta foi realizada com as plantas na fase reprodutiva, em dezembro de 2006. As folhas colhidas foram secas em estufas com circulação de ar forçada, à temperatura constante de 40 °C, durante 72 horas. Em seguida, o material foi triturado em moinho tipo Willey.

### Procedimentos de isolamento e identificação das substâncias químicas

O material seco triturado (1 kg) passou por processo de extração exaustiva com mistura

de solvente água/metanol (3:7), por aproximadamente sete dias, com filtração e recolhimento periódico do filtrado. Após esse período, o metanol foi eliminado a pressão reduzida, em rotavapor (Büchtel 131) à temperatura de 45 °C. Em seguida, a solução aquosa concentrada foi liofilizada, obtendo-se o extrato bruto hidrometanólico das folhas de *S. alata*.

Fracionaram-se 10 g do extrato bruto hidrometanólico das folhas empregando-se coluna cromatográfica por via úmida (CCVU), segundo Matos (1997), com sílica-gel como adsorvente e três solventes (hexano, acetato de etila e metanol) e suas misturas de polaridades crescentes, aplicados sucessivamente (Figura 1).

Ainda de acordo com metodologia proposta por Matos (1997), procedeu-se ao exame de pequenas amostras de cada fração obtida na etapa anterior, em cromatografia de camada delgada, CCD (Aluminum Backed TLC, Silica Gel, Hard Layer, F-254, SAI), usando diversos sistemas de solventes. As cromatoplasmas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 254 nm, em câmara escura. De acordo com as analogias e diferenças de composição, observadas pelas semelhanças das manchas nas cromatoplasmas, foram realizados refrações (Figura 1).

Três refrações foram desenvolvidos, também via CCVU, com eluentes selecionados previamente de acordo com a CCD (Figura 1).

A Figura 2 representa o primeiro refração, realizado a partir de 1,18 g, proveniente da reunião das 50 frações coletadas após a passagem de sistemas de eluentes Hex/AcOEt (1:9) e (2:8) na primeira coluna. Foram obtidas 133 frações nesse refração.

Na Figura 3 é representado o segundo refração, realizado a partir de 0,82 g, proveniente da reunião das 37 frações coletadas após a passagem de sistemas de eluentes Hex/AcOEt (3:7), (4:6), (5:5) e AcOEt 100% na primeira coluna. Foram coletadas 50 frações.

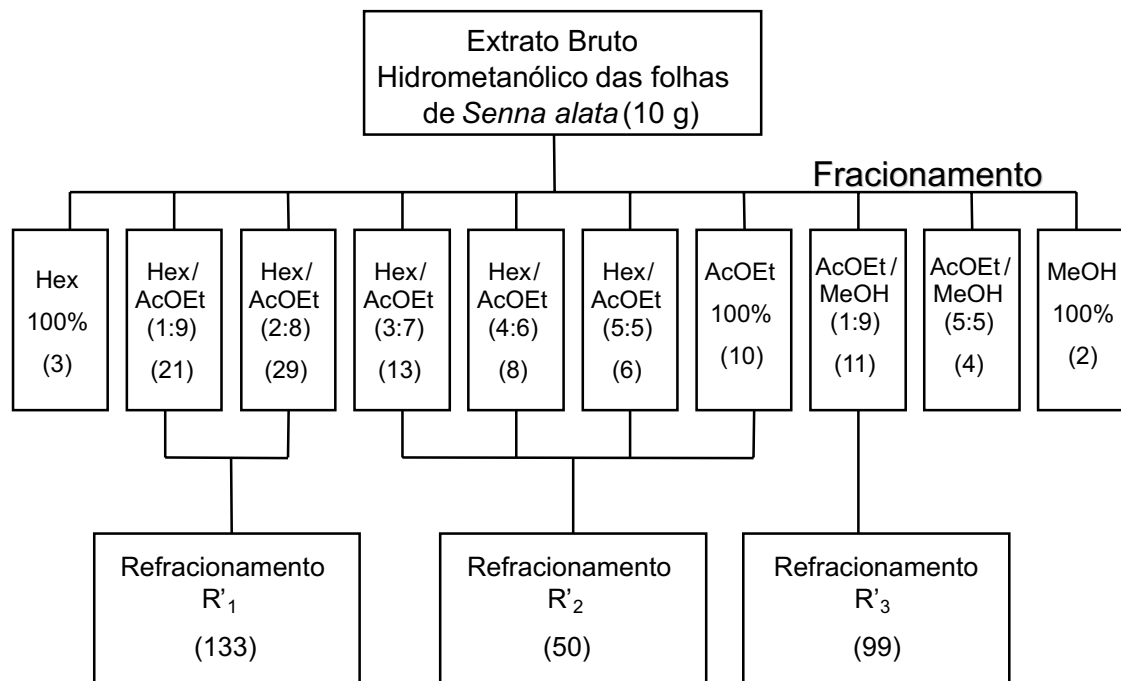
A Figura 4 representa o terceiro refração, realizado a partir de 2,02 g, proveniente da reunião das 11 frações coletadas após a passagem do sistema de eluentes



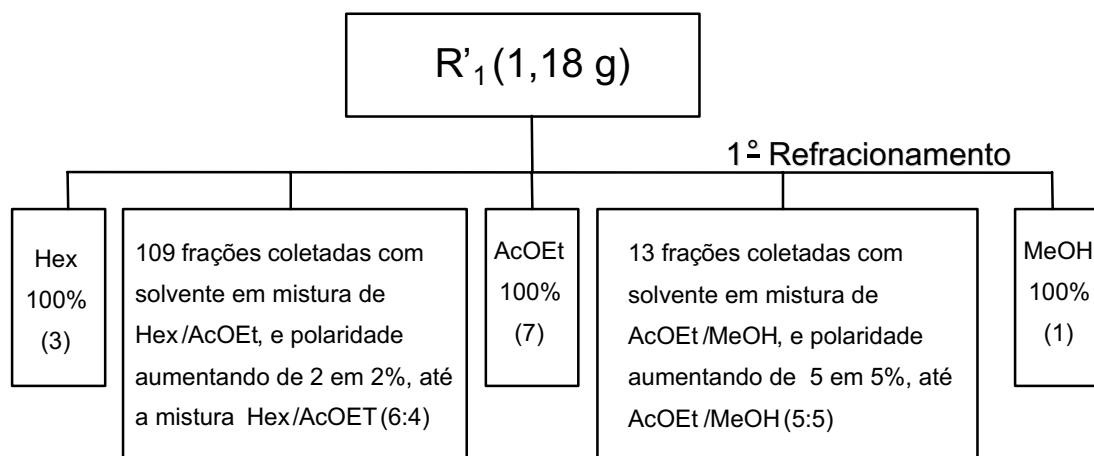
AcOEt/MeOH (1:9) na primeira coluna. Neste, foram coletadas 99 frações.

As frações coletadas passaram novamente por exame em CCD, e aquelas consideradas relativamente puras foram concentradas em

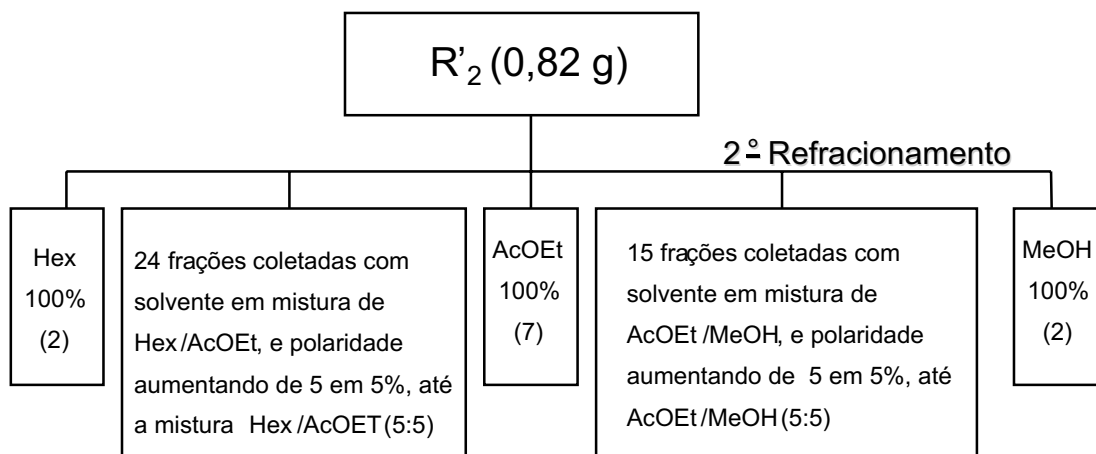
capela de fluxo laminar (PACHANE), ou em rotavapor, pesadas e acondicionadas em pequenos frascos; posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear, para obtenção de espectros.



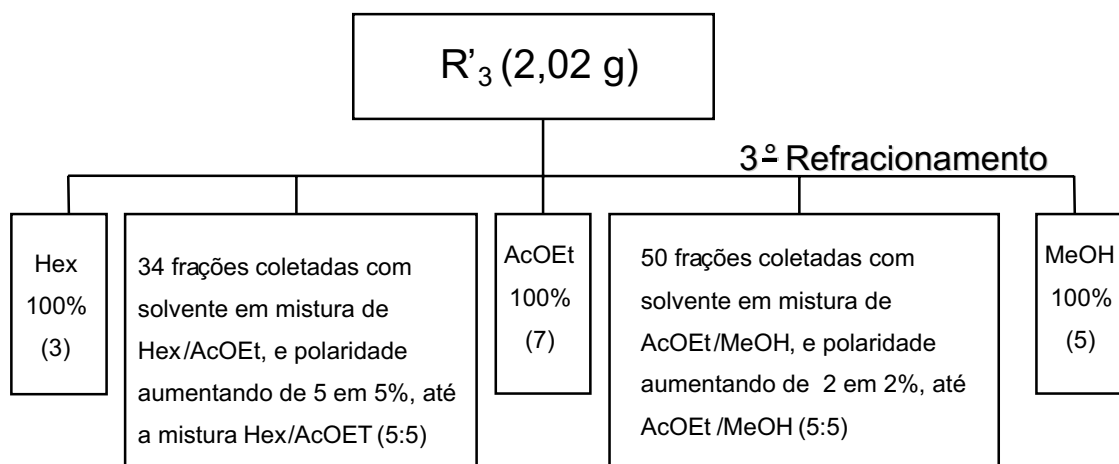
**Figura 1** - Esquema demonstrando os procedimentos de fracionamento e refracionamento partindo-se de 10 g do extrato bruto hidrometanólico de folhas de *Senna alata*. Entre parênteses, a proporção dos solventes ou a mistura destes e o número de frações coletadas em cada etapa.



**Figura 2** - Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes e o número de frações coletadas no primeiro refracionamento de reunião de frações coletadas da primeira coluna.



**Figura 3** - Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes e o número de frações coletadas no segundo refração de reunião de frações coletadas da primeira coluna.



**Figura 4** - Esquema demonstrando as polaridades dos solventes ou mistura destes e o número de frações coletadas no terceiro refração de reunião de frações coletadas da primeira coluna.

As reuniões de frações semelhantes foram submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ), em espectrofotômetro modelo Gemini 300-Varian, 75 MHz (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e 300 MHz (RMN de  $^1\text{H}$ ), para determinação das fórmulas estruturais das moléculas.

Foi realizado ainda um processo de derivatização, como no procedimento realizado por Marín-Loaiza et al. (2008), de uma determinada fração, para injeção em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (modelo GCMS-QP5050A, Shimadzu) em coluna DB5 (30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Nesse processo, 2,8 mg da fração foram dissolvidos em 60  $\mu\text{L}$  de piridina e 100  $\mu\text{L}$  de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) a 70 °C por cerca de 30 minutos e posteriormente injetados diretamente em CG-MS.

#### Espécies receptoras utilizadas nos bioensaios

As espécies receptoras selecionadas para os bioensaios de germinação e desenvolvimento foram:

- malícia, *Mimosa pudica*;





- mata-pasto liso, *Senna obtusifolia*; e
- a espécie doadora *Senna alata*, no bioensaio de autotoxicidade.

Essas espécies são frequentes em áreas de pastagens cultivadas da região Norte (Borges et al., 2007). As sementes foram lavadas com água corrente e tratadas com ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos, em imersão, para quebra da dormência.

### Bioensaios de germinação

A germinação das espécies receptoras foi monitorada em períodos de dez dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (Juntilla, 1976; Duram & Tortosa, 1985). Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro foi forrada com uma folha de papel-filtro qualitativo e recebeu 25 sementes de cada espécie receptora. Os bioensaios foram desenvolvidos em câmaras BOD modelo 3740 (Forma Scientific, Inc. BOX 649 Marietta, Ohio 45750), em condições controladas de 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas.

### Bioensaios de crescimento

Os bioensaios de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foram realizados nas mesmas condições dos bioensaios de germinação, porém o fotoperíodo, nesse caso, foi de 24 horas. Cada placa de Petri, forrada com papel-filtro qualitativo, recebeu três plântulas, de tamanho uniforme, com aproximadamente três dias de germinação. No final do período de dez dias de crescimento, o comprimento da radícula e o do hipocótilo foram mensurados.

### Outros procedimentos experimentais

Para avaliação dos efeitos das substâncias químicas isoladas, utilizaram-se as concentrações de 50, 100, 150 e 200 ppm, tendo como eluente solução hidrometanólica (3:7 v/v). O volume de solução das substâncias químicas testadas foi de 3,0 mL por placa de Petri. A solução-teste foi adicionada apenas uma vez, quando do início de cada bioensaio, sendo,

a partir de então, adicionada apenas água destilada, sempre que necessário. Após a adição do extrato, deixou-se evaporar o solvente e adicionaram-se 3,0 mL de água destilada, mantendo-se dessa forma a concentração original. O tratamento testemunha foi água destilada.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, com exceção da derivatização e injeção em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa, que foi realizada no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa-MG.

### Delineamento experimental e análise estatística

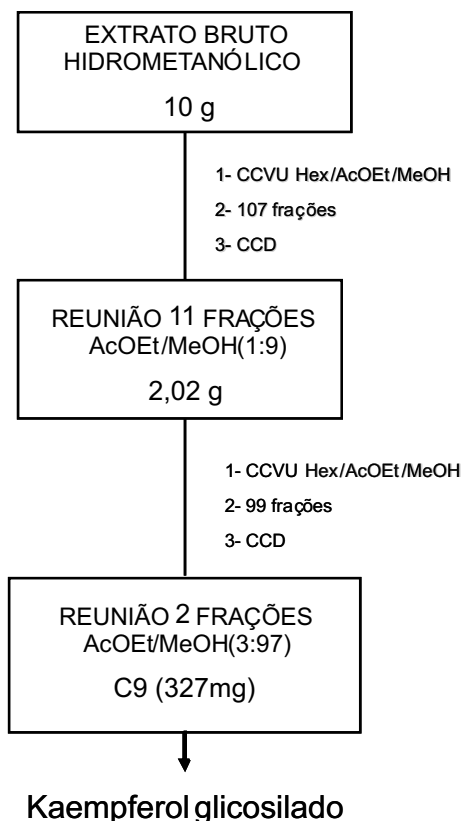
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, em modelo do tipo hierárquico com dois fatores. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey e, quando necessário, submetidas à análise de regressão a 5% de probabilidade. Os dados de germinação e alongamento do hipocótilo foram, ainda, transformados em  $\sqrt{x}$  para seguirem distribuição normal. As análises foram processadas, utilizando-se o programa SAEG (UFV, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Substâncias químicas isoladas das folhas de *Senna alata*

O isolamento das substâncias testadas foi realizado a partir de 10 g do extrato bruto hidrometanólico, totalizando 107 frações após o primeiro fracionamento (Figura 5). As frações com padrão cromatográfico semelhante foram reunidas. Entre as reuniões, foi denominada de R<sub>3</sub> a amostra obtida da junção das 11 frações coletadas na eluição com sistema acetato de etila/metanol (1:9), que totalizou 2,02 g de material seco. R<sub>3</sub> foi submetida a um refractionamento em CCVU, resultando em 99 frações ao final. Todas elas foram novamente analisadas em cromatoplacas, algumas reunidas e seguiu-se então à elucidação das estruturas moleculares dessas substâncias ou classes de compostos por análise dos seus

espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Da reunião das frações 1 e 2 coletadas na eluição do refractionamento de  $\text{R}'_3$  com sistema acetato de etila/metanol (3:97), foram obtidos 327 mg de material seco, que foi chamado de C9.



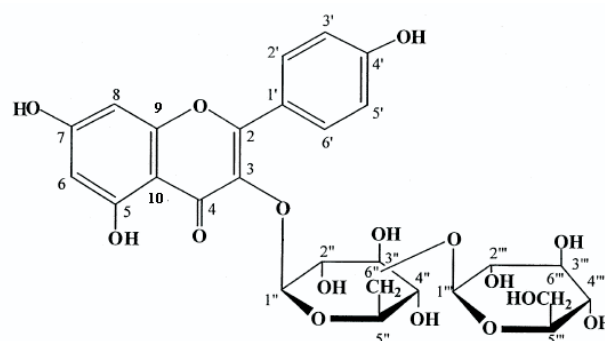
**Figura 5** - Fluxograma sucinto dos procedimentos de isolamento e identificação de substâncias químicas com atividade alelopática presentes em folhas de *Senna alata*.

Comparando os resultados dos deslocamentos químicos dos carbonos ( $\delta_c$ , Tabela 1) dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 da fração C9, com a bibliografia sobre constituintes químicos encontrados em folhas de *S. alata* e com dados de RMN desses constituintes já publicados na literatura (Iwashina et al., 2000; Moriyama et al., 2003), detectou-se a presença de mistura contendo flavonoides glicosilados na amostra C9 (Figura 6 e Tabela 1).

Alguns trabalhos reportaram a presença de kaempferol-3-O-gentiobioside (Figura 6) em folhas de *Senna (Cassia) alata*, composto com atividade alelopática pertencente à classe dos

flavonoides glicosilados (Moriyama et al., 2001). Na Indonésia, Moriyama et al. (2003) quantificaram este metabólito nas diferentes partes da planta e em diferentes estádios de crescimento, demonstrando que as folhas maduras são as que apresentam o maior conteúdo desse produto e, ainda, que durante o período de outubro a dezembro há decréscimo no conteúdo deste flavonoide em folhas juvenis.

O núcleo do flavonoide foi identificado como um kaempferol por comparação de dados do RMN de Iwashina et al. (2000), como pode ser observado na Tabela 1.



Fonte: Moriyama et al. (2003).

**Figura 6** - Estrutura do kaempferol-3-O-gentiobioside quantificado em folhas de *Senna alata*.

**Tabela 1** - Comparação de dados de deslocamentos químicos ( $\delta_c$ ) de RMN de carbono 13 da literatura (Iwashina et al., 2000) de kaempferol-3-O-gentiobioside e da fração C9 coletada neste estudo

$^{13}\text{C}$	C literatura	C fração C9
2	157,6	158,4
3	135,1	132,2
4	178,5	179,4
5	162,6	163,0
6	99,8	99,9
7	166,0	165,9
8	94,6	94,7
9	158,0	159,0
10	105,2	104,7
1'	121,8	122,7
2',6'	132,0	132,2
3',5'	116,1	116,1
4'	161,6	161,5



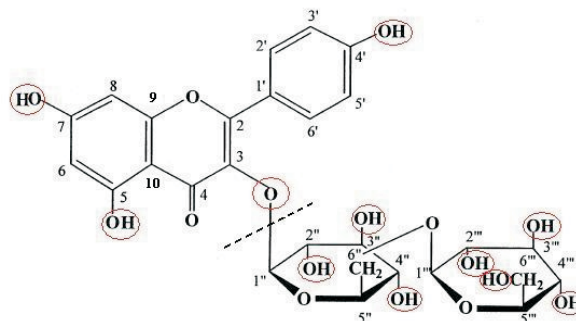
Entre os possíveis métodos de derivatização, a sililação, com recurso ao bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), permite a posterior identificação dos derivados trimetilsililados de alguns compostos. Durante a sililação, os hidrogênios das hidroxilas livres, dos compostos presentes na amostra, são substituídos por um trimetilsilil de massa igual a 73 ( $m/z$  73). Portanto, as massas moleculares dos picos apresentados nos cromatogramas obtidos após essa derivatização são adicionadas de tantas unidades de trimetilsilil quantos forem os números de hidroxilas livres presentes nas moléculas.

O composto kaempferol-3-O-gentiobioside apresenta massa molecular  $m/z$  611  $[M + H]^+$  (Iwashina et al., 2000). Caso ocorra reação de hidrólise na ligação do glicosídeo ao núcleo flavônico (Figura 7), o flavonoide kaempferol livre irá apresentar massa  $m/z$  285, podendo mostrar ligação de quatro unidades de trimetilsilil no lugar das hidroxilas livres (Figura 7), fornecendo massa  $m/z$  575, após a sililação. Já o glicosídeo derivado da hidrólise apresenta massa  $m/z$  325 e poderá apresentar sete unidades de trimetilsilil ligadas à sua estrutura após a sililação, passando a apresentar massa  $m/z$  836.

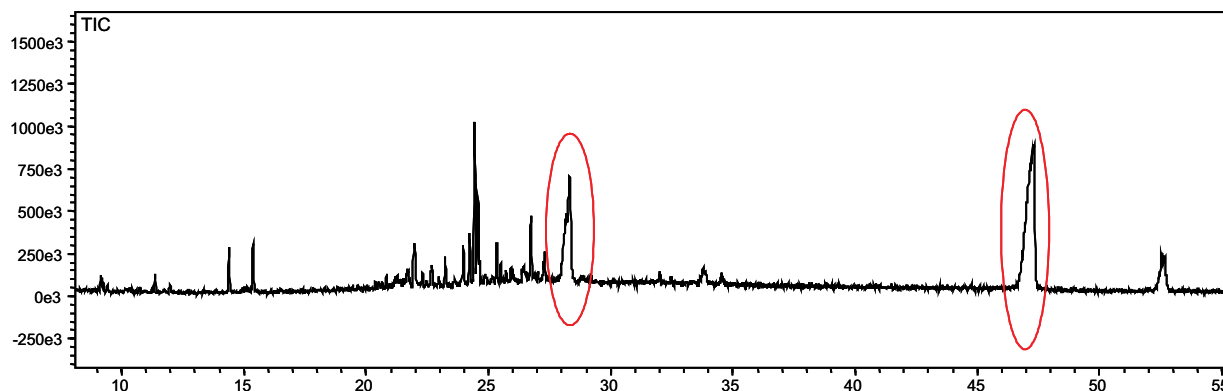
A fração C9 passou pelo processo de derivatização descrito e foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa, fornecendo o cromatograma apresentado na Figura 8.

Analisando os picos obtidos no cromatograma e a comparação dos espectros de massas fornecidos pela biblioteca de massas,

os picos observados nos tempos de retenção de 28,25 e 47,25 min (Figura 8) apresentaram massas de 575 e 838, respectivamente. Portanto, a detecção destes picos no cromatograma indica a presença de um núcleo flavonoide kaempferol e gentiobiosídeo, que poderiam estar ocorrendo livres na amostra ou ter sido derivados de uma hidrólise ocorrida durante os processos de extração da substância ou após a derivatização. Devido ao aspecto caramelizado da amostra C9 e à presença de muitos picos em seu cromatograma (Figura 8), conclui-se que essa amostra não está completamente purificada, dificultando a afirmação da ocorrência exata do composto kaempferol-3-O-gentiobioside. O aspecto caramelizado da amostra é, ainda, um indicio de que ali pode haver muitos açúcares, compostos de polaridades muito altas que dificultam a separação



**Figura 7** - Hidrólise da ligação entre o glicosídeo e o kaempferol da estrutura de kaempferol-3-O-gentiobiosídeo (linha tracejada). Destacadas com um círculo estão as hidroxilas onde é possível ocorrer a ligação de um trimetilsilil no lugar do hidrogênio durante a sililação.



**Figura 8** - Cromatograma da fração C9 – destacados com um círculo estão os picos que apresentaram massas de 575 e 838.



dos flavonoides – esse fato é comum em amostras obtidas de plantas da família Leguminosae.

Outros estudos já identificaram flavonoides do tipo kaempferol glicosilados em Leguminosae -Caesalpinioideae. Como exemplo, o estudo realizado por Pizzolatti et al. (2003) identificou 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilcanferol e 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilcanferol em folhas de *Bauhinia forficata*.

A diversidade dos constituintes químicos das plantas, a ocorrência de pequenas quantidades de constituintes já conhecidos e muito comuns, ao lado de vários outros fatores interferentes, dificultam o trabalho de isolamento e purificação dos princípios imediatos desejados. Entre esses fatores estão as variações de composição devidas a influências das mudanças climáticas e estacionais, a presença de compostos homólogos e isômeros, entre outros (Matos, 1997).

Os extratos brutos de plantas, quando se utilizam solventes polares, são muito complexos e ricos em diversos componentes, de modo geral, dificilmente separáveis. Sua análise cromatográfica direta, via de regra, torna-se extremamente trabalhosa, e sua separação é complicada pela presença de resinas e outros polímeros (Matos, 1997). Por esse motivo, os fitoquímicos, em geral, preferem trabalhar com produtos naturais de baixa e média polaridade; já os biólogos e farmacologistas desejam preferencialmente os mais polares para realizarem bioensaios, inclusive porque tradicionalmente são considerados mais bioativos (Chaves et al., 2000).

#### **Avaliação da atividade alelopática de compostos químicos isolados das folhas de *S. alata***

Os dados obtidos do bioensaio de germinação não apresentaram distribuição normal, motivo pelo qual foram transformados em sua raiz quadrada. A interação entre os fatores não foi significativa, indicando que cada fator (concentrações e espécies) agiu independentemente. Observa-se que as espécies *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica* foram mais afetadas, porém não diferiram entre si. Na maior concentração do extrato C9, as duas espécies apresentaram inibição da germinação

de suas sementes de até 55% (Figura 9). Já os efeitos autotóxicos em *Senna alata* não foram expressivos durante a germinação.

No estudo do alongamento do hipocótilo, verificou-se que não houve interação entre os fatores e os efeitos das diferentes espécies dentro de cada concentração da fração C9.

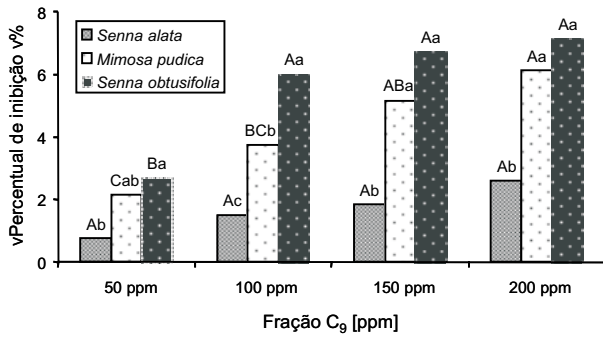
Os dados referentes ao crescimento da radícula mostraram interação significativa entre os fatores espécie *versus* concentração do extrato, ou seja, as concentrações de C9 têm influência no efeito sobre as espécies, e vice-versa. Houve diferenças entre as espécies em todas as concentrações de C9 (Figura 10).

As espécies *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica* foram, novamente, as mais afetadas, com exceção da concentração mais baixa, com cerca de 55 e 45% de inibição do alongamento da radícula, respectivamente, na maior concentração. Nas concentrações intermediárias de 100 e 150 ppm de C9, *M. pudica* foi mais afetada que *S. obtusifolia*, e esta, mais do que *Senna alata*, porém a diferença foi sutil: entre 4 e 7%.

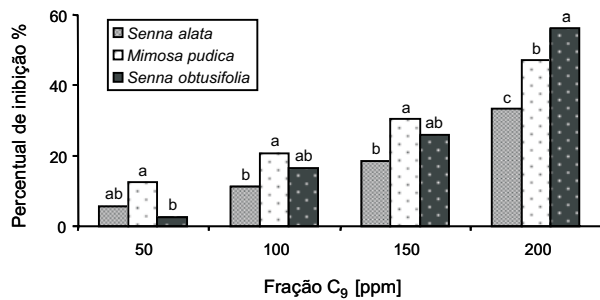
As retas de regressão ajustadas e as equações mostraram o comportamento de cada espécie com o aumento da concentração do extrato (Figura 11). Todas as espécies sofreram inibição gradual significativa no crescimento de suas radículas. A diferença mais acentuada foi indicada para *S. obtusifolia*, com inibição da ordem de 2,6% na menor concentração e 56% na mais alta, passando da menos para a mais prejudicada; isso ressalta a importância de concentrações dos compostos maiores que 200 ppm para a melhor definição dos efeitos inibitórios sobre a radícula das espécies daninhas investigadas. Novamente, *S. alata* foi, em geral, a menos prejudicada.

A fração 4, também coletada na eluição do refraçãoamento de R<sub>3</sub>' com sistema acetato de etila/metanol (3:97), exibiu resultados dos deslocamentos químicos dos carbonos ( $\delta_c$ ) dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 semelhantes aos da fração C9, porém em mistura mais intensa. O teste F realizado com os dados obtidos nos bioensaios de germinação e crescimento inicial não foram significativos a 5% de probabilidade para esta fração.

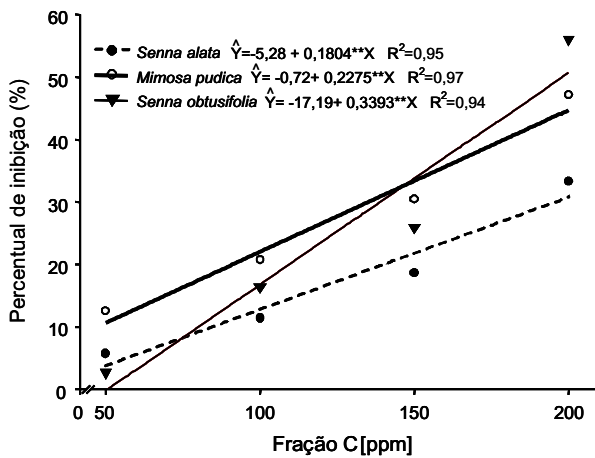




**Figura 9** - Efeito do extrato hidrometanólico da fração C<sub>9</sub> obtida de *S. alata* sobre a germinação de diferentes espécies. Dados expressos em √%. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada espécie e minúscula dentro de cada concentração não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 10** - Efeito do extrato hidrometanólico da fração C<sub>9</sub> obtida de *S. alata* sobre o crescimento da radícula de diferentes espécies. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 11** - Efeito do extrato hidrometanólico da fração C<sub>9</sub> obtida de *S. alata* sobre o crescimento da radícula de diferentes espécies.

Invasoras frequentemente estabelecem monoculturas teóricas, onde comunidades diversas vicejam. Nesse contexto, a alelopátia tem sido sugerida como um dos mecanismos que dirigem a invasão dessas plantas. Algumas espécies invasoras podem ter um impacto alelopático mais forte sobre as outras espécies do local onde foram introduzidas, talvez devido ao fato de que em seus locais de origem as espécies, ao redor, estão mais bem adaptadas aos compostos bioquímicos inerentes (Inderjit et al., 2008).

Em estudos realizados por Simões et al. (2008) com *Sesbania virgata*, também uma leguminosa daninha tropical de crescimento rápido, utilizada em revegetação de florestas devastadas e reabilitação de áreas degradadas, foi observado que metabólitos liberados pelas sementes dessa espécie inibiram o crescimento de *Arabdopsis thaliana* e arroz. O composto responsável por esse efeito alelopático parece ser o flavonoide (+)-catequina, encontrado em alta quantidade no material liberado pelas sementes, no início da inibição. Esses autores sugerem que o fato de suas sementes liberarem grande quantidade de (+)-catequina nos estádios iniciais de desenvolvimento pode representar uma vantagem adaptativa para suas plântulas, que contribui para o seu comportamento invasivo e estabelecimento com sucesso em diferentes solos.

Flavonoides glicosilados, entre outros 13 constituintes detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (electronspray ionization ESI-MS/MS), também parecem ter sido responsáveis pelos efeitos alelopáticos de extratos metanólicos de folhas de *Lonicera maackii* sobre *Arabdopsis thaliana* (Cipollini et al., 2008).

Em geral, ácidos fenólicos afetam em maior intensidade o crescimento inicial do que a germinação (Reigosa & Malvido, 2007), como demonstrado neste estudo.

Pode-se inferir, neste trabalho, que os compostos com atividade alelopática encontrados em folhas de *Senna alata* são substâncias de polaridade muito alta, pertencentes à classe dos flavonoides glicosilados, cujo núcleo aromático é um kaempferol, e que causam inibição intensa, primariamente, sobre o crescimento da radícula e sobre a germinação de

*Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica*. Já os efeitos autotóxicos desse composto são pouco expressivos quando se considera o crescimento da plântula e nulos sobre a germinação. Esses resultados corroboram os encontrados nos testes preliminares realizados com todas as estruturas da planta, confirmando a potencialidade do kaempferol como aleloquímico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, pela bolsa concedida; à Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA; ao Departamento de Química da UFV; ao LASA, UFV; e, em especial, ao químico José Luiz Pereira, pelo auxílio.

## LITERATURA CITADA

AGBAGWA, I. O.; ONOFEGHARA, F. A.; MENSAH, S. I. Stimulation of growth and development of *Celosia argentea* L. by crude extracts of *Senna alata* (L.) Roxb. **J. Appl. Sci. Environ. Manag.**, v. 7, n. 1, p. 9-13, 2003.

AWAL, M. A. et al. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. **J. Med. Sci.**, v. 4, n. 3, p. 88-193, 2004.

BARRESE PÉREZ, Y.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M. E.; PULPEIRO, O. G. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 10, n. 2, p. 1-5, 2005.

BOONKERD, T.; PECHSRI, S.; BAUM, B. R. A phenetic study of *Cassia sensu lato* (Leguminosae-Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae) in Thailand. **Plant Syst. Evol.**, v. 252, p. 153-165, 2005.

BORGES, F. C. et al. Potencial alelopático de duas neolignanais isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-59, 2007.

CHAVES, M. H. et al. Separação e identificação de constituintes químicos polares dos galhos de *Porcella macrocarpa*. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 307-309, 2000.

CHOM, S. U.; KIM, Y. M. Herbicidal potencial and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extrats. **J. Agron. Crop Sci.**, v. 190, p. 145-150, 2004.

CIPOLLINI, D. et al. Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore Effects. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 144-152, 2008.

DAMODARAN, S.; VENKATARAMAN, S. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata*, Linn. Leaf extract against *Pityriasis versicolor*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, n. 1, p. 19-23, 1994.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protec.**, v. 19, p. 583-589, 2000.

DURAM, J. M.; TORTOSA, M. E. The effect of mechanical and chemical scarification of charlock (*Sinapsis arvensis*) seeds. **Seed Sci. Technol.**, v. 13, n. 1, p. 155-163, 1985.

HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of selective phytotoxicity of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) in barnyardgrass and lettuce. **J. Chem. Ecol.**, v. 33, p. 1919-1926, 2007.

INDERJIT et al. Allelopathy and plant invasions: traditional, congeneric, and bio-geographical approaches. **Biol. Invasions**, DOI 10.1007/s10530-008-9239-9 Original Paper, 2008.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. Tribe Cassieae Bronn. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in legume systematics**. Kew: The Royal Botanic Gardens, 1981. Part 1. p. 97-106.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. The American Cassinae, a synoptical revision of Leguminosae, Tribe Cassieae, subtribe Cassinae in the New World. **Mem. New York Botanic Gard.**, v. 35, n. 1-2, p. 1-918, 1982.

IWASHINA, T. et al. Flavonol glycosides from *Asplenium forzeiense* and its “ve related taxa and *A. incisum*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 28, p. 665-671, 2000.

JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physiol. Plant.**, v. 29, p. 264-268, 1976.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 608 p.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MARÍN-LOAIZA, J. C. et al. Pyrrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 154-167, 2008.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M. A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation. **J. Pharm. Soc. Japan**, v. 121, n. 11, p. 817-820, 2001.

MORIYAMA, H. et al. HPLC quantification of kaempferol-3-O-gentiobioside in *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 425-430, 2003.

ORDOÑEZ, M. G.; GOVÍN, E. S.; BLANCO, M. A. G. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. **R. Cub. Plant. Med.**, v. 9, n. 1, 2004.



PIEME, C. A. et al. Evaluation of acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Caesalpinaceae). **Afric. J. Biotechnol.**, v. 5, n. 3, p. 283-289, 2006.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonoides Glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata*. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

PLANTAMED – **Plantas e Ervas Medicinais e Fitoterápicos** Disponível em: <[http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna\\_alata.htm](http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Senna_alata.htm)>. Acesso em: 30 abr. 2007.

REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. **J. Chem. Ecol.**, v. 33, p. 1456-1466, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG: 2000. 142 p.

SIMÕES, K. et al. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 681-687, 2008.

SOUZA-FILHO, A. P. S. **Alelopatia e as plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 159 p.

