

ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS ALELOPÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS TITONINA E TITONINA ACETILADA¹

Comparative Analysis of the Allelopathic Effects of the Chemical Compounds Tithonine and Acetylated Tithonine

SOUZA FILHO, A.P.S.², BORGES, F.C.³ e SANTOS, L.S.⁴

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo estabelecer as variações na atividade alelopática da substância química titonina, em função da acetilação de sua molécula. Bioensaios de germinação (25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas) e de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo (25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 24 horas) foram desenvolvidos. Como planta receptora, utilizou-se a planta daninha *Mimosa pudica* (malícia). Análise de espectros RMN ¹H e ¹³C e técnicas de RMN bidimensionais foram realizadas na molécula acetilada. O processo de acetilação produziu a molécula 3'-acetil-7,4'-dimetoxiflavona, que diferiu da molécula original, identificada como 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona. A estrutura da titonina-Ac foi confirmada pelos espectros de RMN ¹H, ¹³C, DEPT, COSY e HETCOR. A titonina foi acetilada com anidrido acético em piridina. A análise comparativa da atividade alelopática das duas substâncias revelou que titonina-Ac apresentou maior potencial para inibir tanto a germinação das sementes como o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo da planta daninha malícia. A intensidade dos efeitos alelopáticos das duas substâncias esteve positivamente associada à concentração. O conjunto das informações obtidas permite sugerir a possibilidade de se aumentar a atividade alelopática de uma substância química sem comprometer suas peculiaridades biológicas desejáveis à natureza e aos interesses da sociedade.

Palavras-chave: alelopatia, acetilação, estrutura, inibição, molécula.

ABSTRACT - The objective of this paper was to establish the variations in the allelopathic activity of the chemical substance tithonine, in function of the acetylation of its molecule. Germination bioassays, under 25 °C of constant temperature and 12-hour photoperiod, and radicle and hypocotyl development bioassays under 25 °C of constant temperature and 24-hour photoperiod were developed. The receiving plant used was the weed *Mimosa pudica*. Spectral analysis RMN ¹H and ¹³C and bidimensional RMN techniques were carried out on the acetylated molecule. The acetylation process produced the molecule 7,4'- dimethoxy-3'-acetylflavone, which differed from the original molecule, identified as 7,4'-dimethoxy-3'-hydroxyflavone. The structure of the acetylated tithonine was confirmed by the specters of RMN ¹H, ¹³C, DEPT, COSY and HETCOR. Tithonine was acetylated with acetic anhydride in pyridine. The comparative analysis of the allelopathic activity of the two substances showed that acetylated tithonine presented a greater potential to inhibit seed germination, as well as root and hypocotyl development of *M. pudica*. Both tithonine and acetylated tithonine showed the same behavior pattern in relation to substance concentration. The data obtained allow suggesting the possibility of increasing the biological activity of a chemical substance with allelopathic activity without compromising its biological peculiarities, desirable to nature and to the interests of society.

Keywords: allelopathy, acetylation, structure, inhibition, molecule.

¹ Recebido para publicação em 28.7.2005 e na forma revisada em 5.5.2006.

² Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, S/N. 66.095-100 Belém-PA. ³ Pós-Graduando em Química da Universidade Federal do Pará – UFPA, Rua Augusto Corrêa, 01, 66075-900 Belém-PA. ⁴ Professor do Curso de Pós-Graduação em Química da UFPA.



INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido a percepção da importância de estabelecer novos e eficientes métodos de controle de plantas daninhas, que considere a necessidade de preservar os recursos naturais, a qualidade dos alimentos utilizados na dieta dos animais, em geral, e do homem, em particular, e não seja agente fomentador de insatisfações de ordem social. Quando se consideram os problemas decorrentes do uso indiscriminado de herbicidas sintéticos (Anaya, 1999; Killham & Foster, 1996) e o aumento sistemático no número de espécies de plantas daninhas resistentes aos atuais produtos no mundo (Vidal & Meroto, 2001; Heap, 1997; Jasieniuk et al., 1996; Christoffoleti et al., 1994; LeBaron, 1991; Holt & LeBaron, 1990), a necessidade de colocar à disposição da agricultura produtos alternativos assume aspecto ainda mais relevante.

Teoricamente, as substâncias químicas com atividade alelopática podem ser utilizadas diretamente na formulação de bioherbicidas ou então ser modificadas com vistas a aumentar sua atividade biológica. Embora os aspectos que levem ao desenvolvimento de herbicida sejam claros na literatura, algumas substâncias químicas naturais têm servido como estrutura-modelo para obtenção de novos produtos. Vários herbicidas contendo grupos fenólicos são análogos às auxinas, além do fato de que substâncias como o ácido benzóico são freqüentemente descritas com atividade alelopática, sendo a utilização de seus derivados como herbicida (TBA, TIBA, dicamba etc.) bem conhecida (Einhellig & Leather, 1988).

Os procedimentos metodológicos utilizados no isolamento, na identificação e na caracterização da atividade alelopática de substâncias químicas produzidas pelas plantas são demorados e onerosos; além disso, em muitos casos os resultados obtidos fornecem aleloquímicos com baixa atividade inibitória da germinação de sementes e do desenvolvimento da radícula de espécies de plantas receptoras, ou, então, as quantidades obtidas são insuficientes para a realização dos bioensaios, permitindo apenas a realização dos procedimentos de identificação. Bons exemplos desses resultados são encontrados nos trabalhos de Lobo (2004) e Fonseca (2005). Uma alternativa para esse

problema seria a manipulação da molécula química de determinadas substâncias com atividades alelopáticas já comprovadas mediante bioensaios, sem que os procedimentos empregados redundassem no comprometimento das propriedades biológicas, que as tornam importantes fontes alternativas para fazer frente aos problemas que surgem em decorrência da aplicação dos herbicidas disponíveis no mercado.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer as variações na atividade alelopática da substância química titonina, em função da acetilação de sua molécula, em relação às prováveis alterações no potencial alelopático inibitório da germinação de sementes e do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo da planta daninha malícia (*Mimosa pudica*).

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos utilizados na acetilação da substância titonina

Em balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg de titonina, 0,35 mL de anidrido acético, DMAP (em quantidade catalítica) e 8,75 mL de diclorometano. A mistura da reação foi agitada sob refluxo e monitorada por CCDC. Após cinco horas, a mistura reacional foi transferida para um funil de separação e lavada com solução aquosa de HCl a 5,0% (em duas ocasiões, cada uma utilizando 20 mL) e, em seguida, com água até pH neutro. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e, após filtração, a solução foi concentrada sob pressão reduzida, deixando-se em repouso à temperatura ambiente, para cristalização. Os sólidos brancos obtidos em forma de cristais foram recristalizados em metanol, obtendo-se 114 mg de cristais (rendimento quantitativo) com ponto de fusão de 170 – 171,5 °C.

Análise da atividade alelopática

Bioensaios de germinação: foram desenvolvidos em câmaras de germinação, em condições controladas para temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A germinação foi monitorada em período de dez dias, envolvendo contagens diárias e eliminação daquelas sementes germinadas. Consideraram-se sementes germinadas aquelas que exibiam

extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (Duram & Tortosa, 1985; Juntilla, 1976). Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel-filtro qualitativo, recebeu 20 sementes, tratadas com ácido sulfúrico, em imersão por 20 minutos, conforme estabelecido por Souza Filho et al. (1998).

Bioensaio de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo: foram desenvolvidos à semelhança do bioensaio de germinação, com diferença na duração do fotoperíodo, que foi de 24 horas. Cada placa de Petri de 9,0 cm recebeu três sementes pré-germinadas e, ao final de período de dez dias de crescimento, foram medidos os comprimentos da radícula e do hipocótilo.

Procedimentos comuns aos dois bioensaios: para a análise da atividade alelopática das duas substâncias, estabeleceu-se as concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg L⁻¹, tendo como eluente o metanol. Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL da solução, deixando-se evaporar o solvente, adicionando, em seguida, o mesmo volume de água destilada, mantendo,

dessa forma, a concentração original. As soluções foram adicionadas apenas uma vez, no início do experimento, sendo adicionado, a partir de então, apenas água destilada, sempre que se fazia necessário. Como planta-teste receptora, foi utilizada a planta daninha de áreas de pastagens cultivadas *Mimosa pudica* (malícia)

Análise estatística: o delineamento experimental, para todos os bioensaios, foi inteiramente casualizado, com três repetições. Para efeito de comparação da atividade alelopática, utilizou-se, como tratamento-teste, testemunha, a água destilada. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os dados foram analisados utilizando o sistema SAS (SAS, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizaram-se os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C obtidos por Borges (2003) na identificação da substância titonina nas folhas de *Virola michelii*, cujos dados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) e de ¹³C(75 MHz, CDCl₃) obtidos para as substâncias titonina e titonina-Ac

Posição	Titonina		Titonina-Ac	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
2		163,2		161,99
3	6,65 (1H, s)	106,1	6,65 (1H, s)	106,62
4		178,1		177,62
5	8,08(1H, d, J = 9,0 Hz)	126,9	8,10(1H, d, J=8,7 Hz)	127,05
6	6,91 (H, m)	114,3	6,96(1H, dd, J=8,7 e 2,4 Hz)	114,28
7		164,1		164,14
8	6,69(1H, d, J = 2,4 Hz)	100,4	6,93 (1H, d, J=2,4 Hz)	100,42
9		157,9		158,00
10		117,6		117,83
1'		124,8		124,60
2'	7,43 (1H, d, J = 2,3 Hz)	112,4	7,61 (1H, d, J=2,3 Hz)	120,93
3'		146,1		140,00
4'		149,6		153,81
5'	6,91 (2H, m)	110,8	7,06 (1H, d, J=8,8 Hz)	112,51
6'	7,42 (1H, dd, J = 9,0 e 2,3 Hz)	118,8	7,75 (1H, d, J=8,8 Hz)	125,15
OMe	3,90 (3H, s)	55,5	3,90 (3H, s)	55,80
	3,93 (3H, s)	56,0	3,91 (3H, s)	55,95
Me			2,36 (3H, s)	20,57
OCO				168,67



Após a acetilação, a titonina-Ac foi submetida à análise para os mesmos espectros utilizados na determinação da estrutura química da titonina, cujos resultados também são apresentados na Tabela 1. Os espectros obtidos para titonina permitiram definir sua estrutura como sendo 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Figura 1), enquanto para titonina-Ac os espectros indicaram mudança na estrutura para 3'-acetil-7,4'-dimetoxiflavona (Figura 1), ou seja, a diferença entre as duas estruturas foi a presença do grupo acetil na molécula da titonina-Ac, mostrando que o processo de acetilação foi realizado com sucesso.

A análise dos efeitos alelopáticos das duas substâncias sobre a germinação de sementes (Figura 2) e o desenvolvimento da radícula (Figura 3) e do hipocótilo (Figura 4) indicou que a titonina-Ac promoveu inibições superiores àquelas proporcionadas pela titonina original, embora em algumas concentrações diferenças estatísticas ($p > 0,5$) não tenham sido observadas. A tendência geral observada foi de comportamento semelhante entre titonina e titonina-Ac em relação ao fator concentração, à exceção dos efeitos promovidos sobre o desenvolvimento do hipocótilo, especialmente nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L^{-1} , em que se observa pequena distorção na intensidade das inibições promovidas pelas duas substâncias.

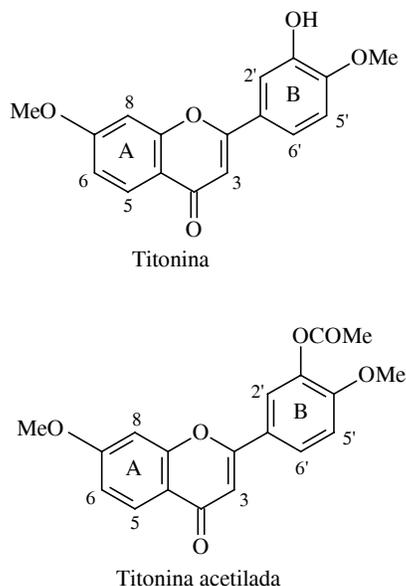


Figura 1 - Estrutura química das substâncias titonina e titonina-Ac.

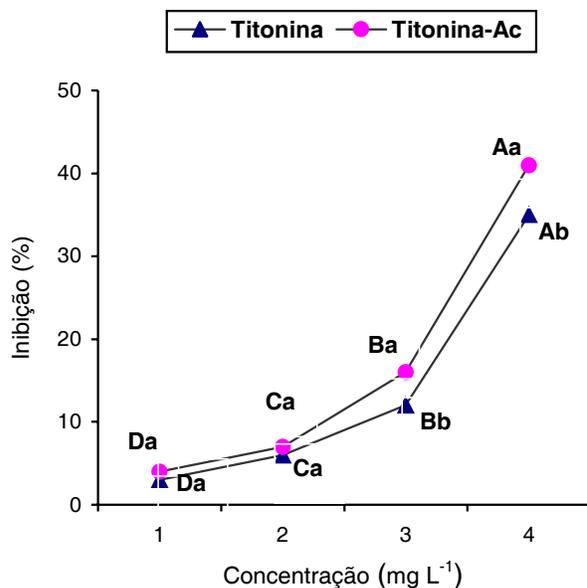


Figura 2 - Efeitos inibitórios sobre a germinação de sementes da planta daninha malícia, efetivados pelas substâncias titonina e titonina-Ac. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

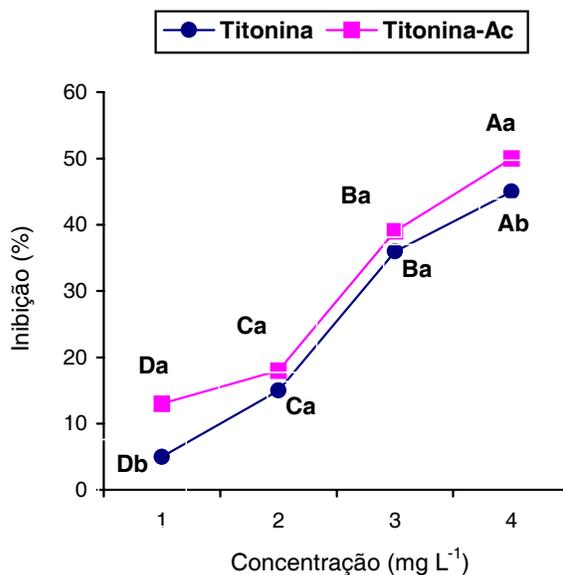


Figura 3 - Efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento da radícula da planta daninha malícia, efetivados pelas substâncias titonina e titonina-Ac. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

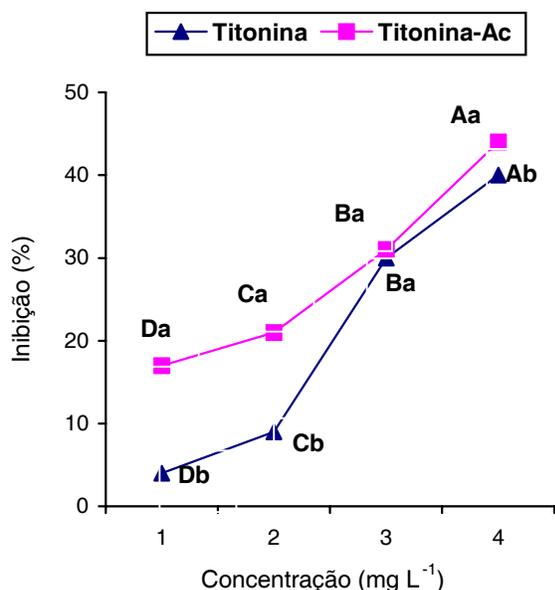


Figura 4 - Efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento do hipocótilo da planta daninha malícia, efetivados pelas substâncias titonina e titonina-Ac. Médias seguidas de letras iguais, maiúscula para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Titonina e titonina-Ac pertencem à classe das flavonas, diferindo em suas estruturas apenas na posição -3' do anel B, em que a titonina-Ac apresenta um grupo acetil e a titonina, um grupo hidróxi. Ao que tudo indica, a posição -3' é importante para a atividade alelopática da molécula; grupos, nessa posição (tipo acetil), que reduzem a densidade eletrônica do Anel B, em relação ao grupo OH, tendem a elevar o potencial da substância como agente alelopático.

Entretanto, esse procedimento produziu redução na solubilidade da substância, ou seja, titonina-Ac tem solubilidade menor que a titonina original. As informações sobre a relação entre a solubilidade de uma dada substância e a intensidade de sua atividade alelopática ainda são limitadas. Os monoterpenos, por exemplo, são considerados de baixa solubilidade em água, quando comparados a outros produtos naturais orgânicos mais polares. A solubilidade em água entre os monoterpenos varia consideravelmente, desde <10 ppm até 6.990 ppm. Os monoterpenos não-oxigenados têm baixa solubilidade em água – todos inferiores a 35 ppm –, porém os monoterpenos

oxigenados, como aldeídos, cetonas, álcoois e éter, têm solubilidade variando de 10 a 100 vezes maior que a dos não-oxigenados, com similar esqueleto (Fischer et al., 1994).

Os efeitos fitotóxicos dos monoterpenos variam tanto quanto sua solubilidade em água, embora, em muitos casos, a atividade desses compostos esteja abaixo de seu nível de solubilidade (Fischer, 1991). A comparação da bioatividade de dois monoterpenos (borneol e cânfora) com a juglona indicou que, apesar de haver variações entre as substâncias e entre as espécies-alvo, a atividade dos monoterpenos foi igual ou superior àquela promovida pela juglona. A solubilidade do borneol e canfor excedeu a da juglona em 5 a 10 vezes (Harborne, 1988; Davis, 1928). Esses dados indicam que generalizações acerca das atividades biológicas e funções ecológicas dos monoterpenos com base nas diferenças na solubilidade em água carecem ser reavaliadas.

As informações obtidas no presente trabalho apontam para a possibilidade de se aumentar a atividade alelopática inibitória de uma dada substância química, via alteração da estrutura da molécula, confirmando a hipótese levantada. Note-se que o processo de acetilação não produziu uma substância química com propriedades indesejáveis para a natureza, até porque o processo não envolveu a utilização de metais pesados ou compostos halogênicos. A substância titonina-Ac manteve, após o processo de acetilação, as mesmas características da substância original, com pequena diferença no grupo acetil. Naturalmente que outras derivações da molécula precisam ser testadas com vistas a determinação do potencial máximo de aumento da atividade alelopática via manipulação. Um bom exemplo a ser testado é a acetilação simultânea de dois grupos metil presentes na molécula.

LITERATURA CITADA

ANAYA, A. L. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.*, v. 18, n. 6, p. 697-739, 1999.

BORGES, F. C. **Estudo fitoquímico, alelopático e farmacológico de constituintes químicos das folhas de *Virola michelii* (Heckel) e *Virola surinamensis* (Rol. Warb.)**. 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.



- CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTORI FILHO, R.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.
- DURAM, J. M.; TORTOSA, M. E. The effect of mechanical and scarification on germination of charlock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.13, n.1, p.155-163, 1985.
- DAVIS, E. F. The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. **Am. J. Bot.**, v. 15, p. 620-621, 1928.
- ENHELLIG, F. A.; LEATHER, G. R. Potential for allelopathy to enhance crop production. **J. Chem. Ecol.**, v. 14, n. 10, p. 1829-1844, 1988.
- FISCHER, N. H.; WILLIAMSON, G. B.; RICHARDSON, D. R. In search of allelopathy in the Florida scrub: the role of terpenoids. **J. Chem. Ecol.**, v. 20, n. 2, p. 1355-1379, 1994.
- FISCHER, N. H. Plant terpenoids as allelopathic agents. In: HARBORNE, J. B.; TOMAS-BARBERAN, F. A. (Eds.). **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Oxford: University Press Oxford, 1991. p. 377-398.
- FONSECA, M.L. **Potencial alelopático de plantas da família Leguminosae**: investigação de aleloquímicos de *Parkia perndula*. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2005.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3.ed. London: Academic Press, 1988. 387 p.
- HEAP, I. M. The occurrence of herbicide-resistant weed worldwide. **Weed Sci.**, v. 51, p. 2235-2244, 1997.
- HOLT, J.; LeBARON, H. M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed Technol.**, v. 4, p. 141-149, 1990.
- JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Sci.**, v. 44, n. 1, p. 176-193, 1996.
- 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.
- KILLMAM, K.; FOSTER, R. **Soil ecology**. New York: Cambridge University Press, 1996. 240 p.
- LOBO, L. T. **Estudo das propriedades alelopáticas de plantas: investigação de aleloquímicos de *Tachigali mymercvophyla* (Leguminosae)**. 2004. 134 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.
- LeBARON, H. M. Distribution and seriousness of herbicide resistant weed infestations worldwide. In: CUSSANS, G. W.; ATKIN, R. N. (Eds.). **Herbicide resistances in weeds crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 27-43.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. **Planta Daninha**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 1998.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM –SAS. **User's guide**. Version 6.4. Cary: 1989. 846 p.
- VIDAL, R. A.; MEROTO, A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: VIDAL, R.A.; MEROTO, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 138-148.

