
QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM SEMENTES DE CINCO ESPÉCIES FLORESTAIS

ANTÔNIO DA SILVA MACIEL
Mestre, Eng^o Florestal, DEF-UFV

AZARIAS MACHADO DE ANDRADE
Dr., Prof. Adjunto, DPF-IF-UFRJ

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar os ácidos fenólicos em sementes de Angico-Vermelho (*Piptadenia macrocarpa* Benth), de Bálsamo (*Myroxylon balsamum* L.), de Cotieira (*Joannesia princeps* Vell.), de Jacarandá-Caviúna (*Dalbergia nigra* Vell.) e de Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* Bert.), em função da grande importância desses compostos para o ciclo de vida das sementes e para os mecanismos biológicos das plantas superiores. Através da extração dos fenóis com etanol 80%, quantificou-se os fenóis totais nas amêndoas e nos tegumentos das sementes, a partir da utilização de uma equação gerada pelo ajustamento de uma curva padrão. Os resultados observados demonstraram a existência de sensíveis diferenças entre as quantidades de constituintes fenólicos nas amêndoas e nos tegumentos das sementes das espécies florestais estudadas, sendo observados valores médios variando de 0,009 a 0,495 miligrama de equivalentes catecol. grama⁻¹ de peso seco para as amêndoas e de 0,036 a 1,826 miligrama de equivalentes catecol. grama⁻¹ de peso seco para os tegumentos.

PALAVRAS-CHAVE: Sementes florestais, compostos fenólicos.

ABSTRACT

TOTAL PHENOLS QUANTIFICATION IN FIVE FOREST SPECIES SEEDS

The objective of this work was to quantify the phenolics acids in seeds of Angico-Vermelho (*Piptadenia macrocarpa* Benth), Bálsamo (*Myroxylon balsamum* L.), Cotieira (*Joannesia princeps* Vell.), Jacarandá-Caviúna (*Dalbergia nigra* Vell.) and Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* Bert.), considering the great importance of this compounds to vital cycle of seed and to biologics mechanisms of superior plants. Across of phenols extraction with eighty per cent etanol, the total phenols were quantifies in almonds and in teguments, making use of an equation derived from a standard curve. The results indicates sensitives differents between the quantities of phenols constituents in almonds and in teguments of analysed species, with medium values of 0,009 to 0,495 catecol equivalent milligram. gram⁻¹ of dry weight in almonds and 0,036 to 1,826 catecol equivalent milligram. gram⁻¹ of dry weight in teguments.

KEY WORDS: Forest seeds, phenolics compounds.

INTRODUÇÃO

Das inúmeras substâncias naturais presentes nos vegetais, muitas têm, por sua ação, despertado o interesse e a atenção de pesquisadores, que buscam elucidar ou melhor esclarecer sua real importância nos processos biológicos da planta. Neste contexto, encontram-se os compostos fenólicos. Esses compostos constituem, provavelmente, um dos

mais disseminados e diversificados grupos de metabólitos secundários de plantas, sendo a sua presença no vegetal, superada apenas pelos carboidratos (PRIDHAM, 1965). Entretanto, ainda hoje, muitos aspectos de seu papel na vida das plantas é motivo de controvérsias entre os estudiosos do assunto.

Estudos têm demonstrado que fenóis podem intervir de várias maneiras nos mecanismos biológicos do vegetal. HENDERSON e NITSCH (1962), mostram que estes constituintes podem atuar como ativadores ou inibidores do sistema enzimático, favorecendo ou não a atividade da auxina, influenciando, conseqüentemente, o crescimento. Nessa mesma linha, ZENK e MULLER (1963), avaliando a ação de vários compostos fenólicos sobre o sistema enzimático AIA-OXIDASE, constataram efeitos sinérgicos com os ácidos clorogênico, cafeico, diidrocafeico e sinápico, os quais atuaram para a manutenção da auxina.

Como substâncias do metabolismo secundário das plantas, os fenóis podem também constituir importantes mecanismos de resistência, em certas interações planta-patógeno, podendo agir tanto por suas propriedades antimicrobianas quanto por inativação do sistema enzimático do mesmo, afetando assim o seu desenvolvimento (GALLI e CARVALHO, 1978). Efeito dos ácidos fenólicos podem também ser observados nos processos biológicos de sementes, como demonstrado por LODHI (1982) que, testando uma mistura equimolar de ácidos fenólicos, encontrou supressão na germinação de sementes. EINHELLIG et al. (1982) também demonstraram os efeitos sinérgicos de fenóis no alongamento de radículas, crescimento de plântulas e germinação de sementes, evidenciando que esses fenômenos sofrem, em diferentes graus, a influência desses constituintes.

Pelo efeito que os ácidos fenólicos podem exercer sobre os mecanismos biológicos de plantas superiores, foi objetivo do presente estudo quantificar esses compostos em sementes de cinco espécies florestais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sementes Florestais, da Universidade Federal de Viçosa.

Sementes de Angico-Vermelho (*Piptadenia macrocarpa* Benth), Bálsamo (*Myroxylon balsamum* L.), Cotieira (*Joannesia princeps* Vell.), Jacarandá-Caviúna (*Dalbergia nigra* Vell.) e Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* Bert.), aparentemente sadias, foram imersas em água por um período de doze horas, tendo, então, separados, manualmente, as amêndoas de seus respectivos tegumentos.

O material obtido foi devidamente identificado e seco em estufa à temperatura de 60°C, sendo, logo após, pulverizado em moinho de facas "Tecnal" e armazenado em vidros com tampas de pressão.

Em seguida, procedeu-se a extração dos fenóis totais, de acordo com o método descrito por BRUNE e VAN LELYVELD (1982), com ligeiras modificações. Para cada extração foram preparadas duas amostras de amêndoas e duas de tegumentos, das sementes de cada espécie.

EXTRAÇÃO EM ETANOL 80%

Neste método, ilustrado na Figura 1, pesaram-se 2,5 gramas de cada amostra, que foram depositadas em balões de destilação contendo, cada um, 25 ml de etanol 80% e mantidas em refluxo por duas horas após o início da fervura. Terminado o refluxo, as amostras foram resfriadas e filtradas, a vácuo, em papel de filtro Framex 391, com a finalidade de remover o resíduo sólido. Em seguida, procedeu-se a evaporação do excesso de etanol em evaporador rotatório, modelo Büchi, a 40°C, sob vácuo, reduzindo o volume original de extrato para, aproximadamente, 9 ml.

As soluções obtidas foram transferidas para balões volumétricos de 100 ml, adicionando-se a seguir, a cada balão, 15 ml de NaOH (2N). Os balões foram fechados, sob nitrogênio, com tampas plásticas e mantidos em agitação, em agitador orbital mod. 255-8, por duas horas. Após a agitação, as soluções foram acidificadas (pH = 2,0) com ácido clorídrico e fracionadas com 25 ml de acetato de etila, em funil de separação, ficando em repouso por duas horas. As frações orgânicas foram coletadas e novamente fracionadas com 25 ml de NaHCO₃ 5%, em funil de separação. Deste tratamento coletaram-se as frações aquosas, sendo, estas, acidificadas (pH = 2,0) com ácido clorídrico e fracionadas com 25 ml de acetato de etila, em funil de separação, ficando em repouso por uma hora e trinta minutos. As frações orgânicas foram recolhidas e evaporadas em evaporador rotatório, a 30°C, até secagem completa. Os resíduos foram ressuspensos em 3,0 ml de etanol e colocados em frascos de 10 ml, lacrados sob nitrogênio e armazenados em refrigerador (+5°C).

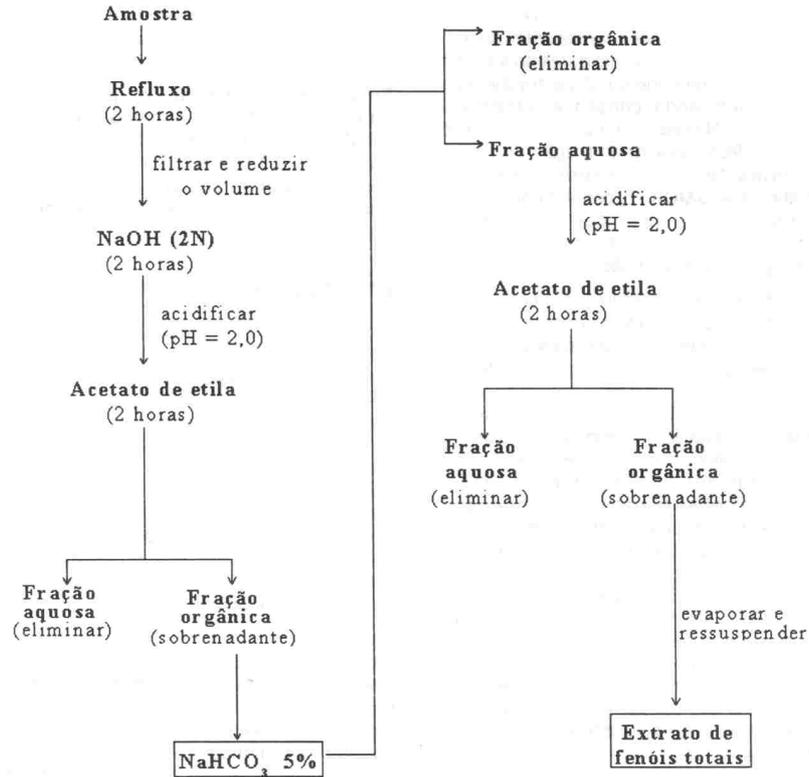


FIGURA 1- Esquema simplificado do método de extração em etanol 80% para obtenção de compostos fenólicos de sementes.

QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS

Para a quantificação dos fenóis totais nos extratos das sementes florestais analisadas, utilizou-se o método de TELES et al. (1982), modificado.

Preparo da Curva-Padrão

Para a calibração da curva-padrão, preparou-se uma solução de catecol em água

destilada (50 mg / 100ml). Desta solução, alíquotas de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 µl foram colocadas em tubos de ensaio, com a adição de água destilada até um volume final, em cada tubo, igual a 150 µl, adicionando-se a seguir 6,0 ml de reagente Folin-Denis diluído na razão de 1:7 (reagente + água). Os tubos permaneceram em repouso por 60 minutos, procedendo-se a leitura da absorbância a 725 nm, em espectrofotômetro digital "Micronal", mod. 334221. A calibração do

aparelho foi feita utilizando-se água destilada e reagente como padrões de controle.

Com as alíquotas de solução catecol e as correspondentes leituras de absorbância, pontos foram plotados e sobre eles ajustado um modelo linear que gerou uma equação utilizada para quantificar os fenóis totais. O modelo ajustado, foi o seguinte:

$$A = \beta_0 + \beta_1 (X) + \epsilon \text{ (modelo 1), onde:}$$

A = Absorbância (nm);
 X = Concentração de fenóis totais por ensaio (ul. ensaio⁻¹); e,
 e = Erro aleatório.

Determinação dos Fenóis Totais nos Extratos

Para quantificar os fenóis totais, efetuaram-se, preliminarmente, testes, em cada extrato, a fim de verificar se as leituras de absorbância, das respectivas concentrações, estavam dentro dos limites estabelecidos pela curva-padrão. Adequado este parâmetro, três alíquotas de cada amostra foram colocadas em tubos de

ensaio (Tabela 1), deixados em repouso por 60 minutos, a partir da adição do reagente de Folin-Denis, procedendo-se, em seguida, a leitura das absorbâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS NAS SEMENTES

A equação para o cálculo das concentrações, em l. ensaio⁻¹, de fenóis totais nos extratos, resultou do ajustamento do modelo 1. Esta equação, utilizada na elaboração do Quadro 1, foi a seguinte:

$$A = -0,02304 + 0,00323 (X) \text{ onde:}$$

A = Absorbância (nm); e,
 X = Concentração de fenóis totais por ensaio (ul. ensaio⁻¹).

Os coeficientes de determinação e de variação foram 99, 80% e 2,67%, respectivamente.

TABELA 1 - Volumes de extrato por amostra de amêndoa (A) e de tegumento (T), das sementes das espécies florestais utilizadas na determinação de fenóis totais.

Amostras e Rep.	Alíq.	Volume de Extrato (ul)				
		Angico Vermelho	Bálsamo	Cotieira	Jacarandá-Caviúna	Pinheiro-do-Paraná
A	1	600	70	600	600	600
		600	70	600	600	600
		600	70	600	600	600
	2	600	70	600	600	600
		600	70	600	600	600
		600	70	600	600	600
T	1	600	40	100	100	40
		600	40	100	100	40
		600	40	100	100	40
	2	600	40	100	100	40
		600	40	100	100	40
		600	40	100	100	40

Para o cálculo de equivalentes catecol (EC), em mg. g⁻¹, empregou-se uma equação generalizada da forma apresentada a seguir:

$$EC = (\text{mg. g}^{-1}) = \frac{X \cdot 0,6}{a}$$

- EC= Equivalentes catecol (mg. g⁻¹);
 X = Concentração de fenóis totais por ensaio (v. ensaio⁻¹);
 a= Aliquota de extrato consumida por leitura de absorbância (v l); e, 0,6 = Fator derivado do produto entre a concentração de solução padrão catecol (0,5 mg. ml⁻¹) e o volume final de extrato (3,0 ml), pela quantidade de material utilizado para extração (2,5 g).

O Quadro 1 mostra os valores médios de fenóis totais, quantificados nos extratos de amêndoa e de tegumento, das sementes de cada espécie florestal.

Percebe-se, pelos valores apresentados no Quadro 1, que o teor de fenóis totais nas amêndoas foi, de maneira geral, inferior àqueles quantificados nos respectivos tegumentos. Observa-se, também, que as amêndoas da Cotieira (*Joannesia princeps* Vell.) e do Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* Bert.) apresentaram valores

considerados quimicamente insignificantes, merecendo confirmação pela efetuação de novas leituras, empregando-se níveis mais elevados de material (BRUNE, 1990). As amêndoas das sementes de Angico-Vermelho (*Piptadenia macrocarpa*), de Bálsamo (*Myroxylon balsamum*) e de Jacarandá-Caviúna (*Dalbergia nigra*) apresentaram elevados teores de fenóis totais, sendo os maiores valores observados nas amêndoas de Jacarandá-Caviúna e os menores nas amêndoas de Bálsamo.

As análises dos tegumentos das sementes, das espécies florestais estudadas, demonstraram que os teores mais elevados de fenóis são observados nos extratos de Jacarandá-Caviúna, de Cotieira e de Pinheiro-do-Paraná, sendo os maiores teores correspondentes ao extrato da última espécie. No tegumento das sementes de Angico-Vermelho foram detectadas concentrações médias de fenóis totais e, no tegumento das sementes de Bálsamo, as menores concentrações. O Bálsamo apresentou uma peculiaridade, quando foram comparadas as concentrações de fenóis totais nas suas amêndoas com os respectivos tegumentos: ambas as regiões da semente apresentaram o mesmo teor de fenóis, sendo esta, no presente estudo, uma característica exclusiva desta espécie florestal.

QUADRO 1 - Valores médios de fenóis totais, com os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação (CV), obserados na amêndoa e no tegumento das sementes das cinco espécies florestais

Espécies Florestais		Fenóis Totais *	
Nome Vulgar	Nome Científico	Amêndoa	Tegumento
Angico-Vermelho	<i>Piptadenia macrocarpa</i>	0,054 ± 0,001 CV = 1,85%	0,329 ± 0,014 CV = 4,25%
Bálsamo	<i>Myroxylon balsamum</i>	0,036 ± 0,001 CV = 2,85%	0,036 ± 0,001 CV = 2,77%
Cotieira	<i>Joannesia princeps</i>	0,016 ± 0,002 CV = 12,50%	1,090 ± 0,011 CV = 1,00%
Jacarandá-Caviúna	<i>Dalbergia nigra</i>	0,495 ± 0,006 CV = 1,21%	1,342 ± 0,010 CV = 0,74%
Pinheiro-do-Paraná	<i>Araucaria angustifolia</i>	0,009 ± 0,001 CV = 11,11%	1,826 ± 0,007 CV = 0,38%

* Em miligrama de equivalentes catecol por grama de peso seco.

Outra inferência que pode ser feita, ao serem comparadas as concentrações de fenóis nas amêndoas e nos tegumentos das sementes florestais é a seguinte: as sementes do Pinheiro-do-Paraná e da Cotieira apresentam, em suas amêndoas, níveis insignificantes de constituintes fenólicos, quando comparados aos valores observados nos seus respectivos tegumentos. Nas sementes das demais espécies estudadas, não foram percebidas diferenças acentuadas entre as concentrações de fenóis totais na amêndoa e no tegumento.

Considerando-se a semente como um todo, as espécies que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos foram o Jacarandá-Caviúna e o Pinheiro-do-Paraná. Nas sementes do Angico-Vermelho e da Cotieira também foram observados teores expressivos de fenóis totais, sendo aqueles verificados no Angico-Vermelho mais significativos. A semente de Bálsamo, ao contrário das demais, apresentou baixos teores de constituintes fenólicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao se tratar de sementes florestais, em função da importância dos constituintes fenólicos e das influências que os mesmos exercem sobre os processos biológicos dos vegetais, é importante que estes sejam devidamente identificados, através de métodos qualitativos apropriados. Após isolados, recomenda-se a realização de estudos que resultem na comprovação das significativas interferências destes compostos sobre o ciclo de vida da semente.

BIBLIOGRAFIA

- BRUNE, W. (Professor Titular). Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 1990. (Comunicação Pessoal)
- BRUNE, W. & VAN LELYVELD, L. J. Biochemical comparison of leaves of five avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and its possible association with susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathologische Zeitschrift* 104: 243-254, 1982.
- EINHELLIG, F. A.; SCHON, M. K.; RASMUSSEN, J. A. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. *J. Plant*, 4: 251-258, 1982.
- GALLI, F. & CARVALHO, P. C. T. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: GALLI, F. Manual de Fitopatologia. Vol. 1, Agronômica Ceres, São Paulo SP, p. 176-178, 1978.
- HENDERSON, J. H. M. & NITSCH, J. P. Effect of certain phenolic acids on the elongation of Avena first internodes in the presence of auxin and tryptophan. *Nature*, 195 (4843): 780a2, 1962.
- LODHI, M. A. K. Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its autoallelopathy. *Can J. Bot.* 57: 1083-1088, 1982.
- PRIDHAM, J. B. Low molecular weight phenols in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 16: 13-36, 1965.
- TELES, F. F. F.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J. S. Determinação de fenóis em cultivares de mandioca. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1982. np.
- ZENK, M. H. & MULLER, G. In vivo destruction of exogenously applied indolyl -3-acetic acids influenced by naturally occurring phenolic acids. *Nature*, 200 (4908): 761-3, 1963.