

Atividade alelopática de extratos de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees sobre a germinação e o crescimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.)

Allelopathic activity of *Ocotea puberula* (Rich) Nees. extract on the germination and initial growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Daiana Jungbluth

daianaj@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Daniel Reis Soares Silva

dsilva@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Edicléia Aparecida Bonini e Silva

boninibio@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade alelopática de extratos CHCl_3 e AcOEt das folhas de *O. puberula* sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (*alface*). O extrato etanólico foi obtido a partir do material seco e moído. O extrato bruto foi solubilizado em etanol e acidificado (fração hidroalcoólica). A fração C_6H_{14} foi obtida por extração líquido-líquido da fração hidroalcoólica, mesmo procedimento utilizado para extração da fração AcOEt . A fração hidroalcoólica foi basificada e extraída com CHCl_3 . O perfil químico das frações obtidas foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se reveladores específicos. A análise por CCD confirmou a presença de alcalóides como compostos majoritários nas frações AcOEt e CHCl_3 . As frações foram avaliadas quanto ao potencial alelopático, nas concentrações de $0,8 \text{ gmL}^{-1}$, $0,4 \text{ gmL}^{-1}$ e $0,2 \text{ gmL}^{-1}$. Os testes de germinação foram realizados em câmara germinativas à 25°C , em placas de Petri contendo 25 sementes de alface com quatro repetições. Para o teste de crescimento foram utilizadas 10 plântulas por placa de Petri pré-germinadas seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Scoot-Knoot ($p>0,05$). Os parâmetros germinativos analisados foram porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). As frações AcOEt e CHCl_3 , extraídas das folhas de *O. puberula*, apresentaram influência alelopática sobre a germinação de alface. No entanto a CHCl_3 mostrou-se mais efetiva, provocando uma redução acentuada na %G no CR e no tempo de germinação das sementes.

PALAVRAS-CHAVE: Alelopatia. Lauraceae. Controle plantas daninhas. Germinação.

Recebido: 31 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.





ABSTRACT

The objective of this work was to measure the allelopathic activity of extracts CHCl_3 and AcOEt from the leaves of *O. puberula* on the germination of *Lactuca sativa* L. (lettuce). The ethanolic extract was obtained from the dried and milled leaves. The crude extract was solubilized in ethanol and acidified (hydroalcoholic fraction). The C_6H_{14} fraction was obtained by liquid-liquid extraction of the hydroalcoholic fraction, the same procedure was used to extract the AcOEt fraction. The hydroalcoholic fraction was basified and extracted with CHCl_3 . The chemical profile of the obtained fractions was analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using specific revelators. TLC analysis confirmed the presence of alkaloids as majority compounds in AcOEt and CHCl_3 fractions. The fractions were evaluated for allelopathic potential on lettuce cypselas at 0.8 g mL^{-1} , 0.4 g mL^{-1} and 0.2 g mL^{-1} . Germination tests were carried out in a growth chambers at 25°C with Petri dishes containing 25 lettuce cypselas with four replicates. For the growth test, were used ten pre-germinated seedlings per petri dish, we followed the same procedures as above. The data were submitted to ANOVA and compared by the Scoot-Knoot test ($p > 0.05$). The germination parameters analyzed were: germination percentage (% G) and germination speed index (IVG). The AcOEt and CHCl_3 fractions, extracted from the leaves of *O. puberula*, revealed allelopathic influence on lettuce germination. However, CHCl_3 showed to be more effective, with marked reduction in the %G and CR and in the germination time of the seeds.

KEYWORDS: Allelopathy. Lauraceae. Control weeds. Germination.

INTRODUÇÃO

O termo alelopatia pode ser considerado como, qualquer efeito direto ou indireto que uma planta ou microrganismo exerce sobre outra planta, mediante a produção de compostos químicos liberados no ambiente (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Estes compostos liberados no ambiente são denominados de aleloquímicos ou metabólitos secundários. Cada espécie vegetal pode sintetizar mais de um tipo de metabólito secundário (FERREIRA, 2004). Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos, estão as substâncias pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (MONTEIRO e VIEIRA, 2002).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes plantas, incluindo as pertencentes ao gênero *Ocotea*, visando o isolamento e a caracterização de compostos químicos. Dentre os metabólitos vegetais identificados, destacam-se os alcalóides benzilisoquinolínicos e aporfínicos, as lignanas e neolignanas, os monoterpenos, os sesquiterpenos e os fenilpropanóides (FARAGO et al., 2005).

A utilização de herbicidas é o principal recurso no controle de plantas invasoras, com isso, é evidente a necessidade da busca por novas alternativas de manejo para o controle das espécies daninhas resistentes, dentre as alternativas de manejo disponíveis, interações alelopáticas entre plantas podem ser usadas como um método eficiente para o controle de plantas daninhas resistentes (RODRIGUES, 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de frações químicas extraídas de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (*O. puberula*), espécie nativa da flora brasileira, verificando sua ação sobre a germinação e o crescimento inicial da espécie bioindicadora de alelopatia, *Lactuca sativa* L. (alface).

MÉTODOS

As folhas foram coletadas da espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees localizada na Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) de Santa Helena no Oeste do estado do Paraná nas coordenadas 24°51'05.3"S 54°21'06.1"W. A espécie foi coletada no mês de agosto de 2017.

As folhas foram cuidadosamente separadas e secas em estufa com temperatura de 60°C por 24 horas. Após este período as amostras foram processadas em um moinho de facas e armazenadas em um freezer até a data da obtenção do extrato.

Para obtenção do extrato etanólico utilizou-se 300g do material seco e moído. No material vegetal adicionou-se 600mL de etanol mantendo-se em banho ultrassônico por 60 minutos e filtrado utilizando filtração a vácuo. Este procedimento foi realizado por três vezes utilizando a mesma amostra. O solvente resultante das três extrações foi reunido e evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida. O rendimento do extrato bruto foi calculado em relação a massa inicial seca resultando em 32g (10,6%).



Para obtenção das frações solubilizou-se 15g de extrato bruto em 80mL de etanol e adicionou-se 160mL de água acidificada (pH 2) fornecendo a fração hidroalcoólica. A fração hexânica (C₆H₁₂) foi obtida por extração líquido-líquido da fração hidroalcoólica adicionando-se 80mL de hexano. Este procedimento foi realizado três vezes. O C₆H₁₂ foi evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida resultando em 4,3g (28,7%) desta fração.

A fração acetato de etila (AcOEt) foi obtida utilizando o mesmo procedimento descrito acima. O rendimento desta fração foi de 1,9g (12,7%). Para a obtenção da fração clorofórmica (CHCl₃) a fração hidroalcoólica foi basificada a pH 7 (NaOH 5%). Posteriormente realizou-se extração líquido-líquido adicionando 80mL de CHCl₃ a fração hidroalcoólica basificada. Este procedimento foi realizado 3 vezes. O CHCl₃ foi evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida resultando em 0,36g (2,4%) desta fração. O extrato bruto e as frações foram armazenadas sob refrigeração.

O perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações foi analisado em cromatoplasmas de sílica gel 60 UV_{254nm} da marca Macherey-nagel[®] utilizando várias fases móveis: CHCl₃/AcOEt 1:9 e AcOEt/MeOH 8:2. As composições das amostras foram comparadas semiquantitativamente, com a aplicação de 5µL de soluções das amostras a 10mg/mL, sendo aplicadas com a utilização de capilares. As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda 254nm e reveladas com reagente específico para a classe de alcaloides, reagente Dragendorff.

Os testes de germinação foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Santa Helena, em incubadora do tipo BOD da marca LimaTec[®] com fotoperíodo (12 horas), temperatura controlada (25 °C) e umidade relativa de 70%.

Para as avaliações de germinação as sementes utilizadas no estudo foram acondicionadas em placas de Petri, as quais foram previamente preparadas, contendo dois discos de papel germitest cada. As sementes de alface Cult. GrandRapids foram dispostas sobre o papel germitest umedecido com a solução desejada.

As placas de Petri foram umedecidas com 5mL de cada solução (água, e as frações de 0,2, 0,4, e 0,8g mL⁻¹ de AcOEt e de CHCl₃). Cada unidade experimental foi constituída de três placas de Petri contendo 25 sementes, resultando em 21 placas e 525 sementes ao total, esse teste foi realizado duas vezes. Após a colocação das sementes, as placas foram transferidas para a câmara de crescimento do tipo BOD a 25° C com 12 horas de fotoperíodo e umidade de 70% até o término do experimento (sete dias).

Durante o experimento procedeu-se um acompanhamento diário das condições de temperatura e fotoperíodo, bem como, a contagem e retirada das sementes germinadas. Foram consideradas como germinadas as sementes que apresentaram protrusão de radícula (±2mm) (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Para o cálculo da percentagem de germinação foi usado a fórmula %G= (N/25) x 100, onde N (número de sementes germinadas ao final do teste unidade dividido por 25 que era o total de sementes por placa, multiplicado por 100 para a percentagem (FERREIRA e AQUILA, 2000). Para o cálculo do Índice de Velocidade de Germinação foi utilizado a fórmula IVG= Σ (ni/ti), onde ni é o

número de sementes que germinaram no tempo 'i' e ti é o tempo após instalação do teste, $i = 1 \rightarrow X$ dias (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

Para os bioensaios de crescimento inicial foram utilizadas plântulas de alface *Cul. GrandRapids*. A obtenção das plântulas ocorreu com a pré-germinação das sementes de alface em água destilada, sob as condições descritas no item anterior.

Após a protrusão da radícula (2mm), 10 plântulas foram transferidas para placas de Petri de vidro (9 cm), contendo dois discos de papel filtro e as soluções das frações de *O. puberula* (AcOEt e CHCl_3) nas concentrações de 0,2, 0,4 e $0,8\text{mg mL}^{-1}$ e água destilada para determinar o controle. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD a 25°C com 12 horas de fotoperíodo e umidade de 70% até o término do experimento (sete dias). Nesta amostragem utilizou-se então 10 sementes por placa, com quatro repetições de cada tratamento, totalizando em 280 sementes.

A mensuração do crescimento foi realizada após sete dias de incubação, utilizando papel milimetrado para medir o comprimento da raiz primária. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do perfil químico do extrato bruto e frações das folhas de *O. puberula* por CCD indicou a presença de alcalóides nas frações CHCl_3 e AcOEt com a revelação do reagente Dragendorff, específico para esta classe de metabólitos secundários. A fase móvel AcOEt/MeOH 8:2 demonstrou a melhor separação dos compostos.

Todas as concentrações do extrato CHCl_3 reduziram significativamente a %G e o IVG quando comparados ao controle (Tabela 01), sendo que a maior concentração ($0,8\text{mg mL}^{-1}$) causou uma redução de 50% na %G e de 80% no IVG. A fração AcOEt não inibiu significativamente a germinação das sementes de alface. No entanto, o IVG teve redução significativa em todas as concentrações avaliadas. Candido, et al (2016) avaliando os efeitos alelopáticos do extrato de folhas de *O. pulchella* verificaram que a fração AcOEt desse extrato inibiram em 45% e 65% a germinação de alface e tomate, respectivamente.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Lactuca sativa* L. sob frações de folhas de *O. puberula*

Frações	Concentrações	%G	IVG
CHCl_3	controle	99 a	13.475 a
	$0,2\text{ mg.mL}^{-1}$	85 b	7.432 b
	$0,4\text{ mg.mL}^{-1}$	72 c	3.870 c
	$0,8\text{ mg.mL}^{-1}$	50 c	2.635 c
AcOEt	Controle	99 a	14.100 a
	$0,2\text{ mg.mL}^{-1}$	95 a	8.675 b
	$0,4\text{ mg.mL}^{-1}$	94 a	7.522 b
	$0,8\text{ mg.mL}^{-1}$	91 a	5.010 c

*Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais na coluna, não apresentam diferenças estatísticas entre si, por meio dos testes ANOVA comparados por Scott-Knott ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria (2018).

Com relação ao IVG, nota-se pela Tabela 01 que houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, em ambos os extratos testados. Dentre os extratos testados no bioensaio a concentração de $0,8\text{g mL}^{-1}$ da CHCl_3 foi a mais efetiva, reduzindo em até 80% o IVG, proporcionando maior redução no tempo de germinação das sementes e promovendo atraso na germinação. Apesar de não ter causado efeito negativo na germinação, a fração AcOEt, também na concentração de $0,8\text{g mL}^{-1}$, inibiu em aproximadamente 65% o IVG das sementes de alface.

Todos os extratos de folhas de *O. puberula* causaram diminuição do crescimento do sistema radicular e os maiores efeitos foram verificados nas plântulas submetidas às CHCl_3 (Tabela 02). O perfil de atividade do extrato CHCl_3 das folhas apresentou uma relação dose-resposta na qual aumento na concentração de 0,2 até $0,8\text{g mL}^{-1}$ resultou numa inibição de aproximadamente 75% no comprimento das raízes de alface.

Tabela 2 - Comprimento radicular (cm) de plântulas de *Lactuca sativa* sob frações de folhas de *O. puberula*

FRAÇÕES	CONCENTRAÇÕES	CR (cm)
CHCl_3	Controle	2.716 a
	$0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.845 b
	$0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.115 c
	$0,8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.705 d
AcOEt	Controle	2.843 a
	$0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.913 b
	$0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.740 b
	$0,8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.661 b

*Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais na coluna, não apresentam diferenças estatísticas entre si, por meio dos testes ANOVA comparados por Scott-knott ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria (2017).

Mesmo não se observando diferença estatística entre a AcOEt dos extratos das folhas de *O. puberula* sobre a germinação das sementes de alface, o crescimento dessas foi afetado negativamente por todas as concentrações avaliadas, no entanto, sem apresentar relação dose-resposta. Pode-se inferir que a atividade apresentada pela fração AcOEt pode estar sendo influenciada por outros metabólitos presentes nesta fração como observado pela análise por CCD.

A alelopatia pode ser considerada uma alternativa viável no manejo de plantas daninhas, devido a seu excelente potencial de interação e importância ecológica, assim como a possibilidade de fornecer novas estruturas químicas para produção de bioativos que combatam as pragas ou plantas invasoras e sejam menos danosos ao ambiente.



CONCLUSÃO

As frações (CHCl₃ e AcOEt) obtidas a partir do extrato de folhas de *O. puberula* apresentaram influência alelopática sobre a espécie *L. sativa*. A AcOEt não alterou a germinação das sementes alface, porém diminuiu significativamente o IVG e o CR, não apresentando relação dose-resposta nos tratamentos. Já o extrato CHCl₃ das folhas de *O. puberula* mostrou-se mais efetivo, visto que provocou redução significativa de todos os índices avaliados e em todas as concentrações testadas, indicando uma inibição dose-resposta entre os tratamentos.

REFERÊNCIAS

FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(3): 250-255, Jul./Set. 2005.

FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. 323 p.

FERREIRA, A. G. **Interferência: competição e alelopatia**, In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 16.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000. (Edição especial).

MONTEIRO, C. A.; VIEIRA, E. L. **Substâncias alelopáticas**. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. 1ª ed. Maringá: EDUEM, 2002, p. 79-104.

RODRIGUES, N, C.; **Alelopatia no manejo de plantas daninhas**. Sete Lagoas. 2016

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Santa Helena pelo apoio a pesquisa.