10º **ENTEC – Encontro de Tecnologia: 28 de novembro a 3 de dezembro de 2016**

ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ALELOPÁTICAS NOS EXTRATOS DE EUCALIPTO (Eucalyptus ssp.) E SEUS EFEITOS EM CULTURAS ALVO.

HORTÊNSIA PIO OLIVEIRA SILVA[1]*; ADRIANO DAWISON DE LIMA* [2]*; ANA CLAUDIA CHESCA* [3]*; MAURO LUIZ BEGNINI*[4]
[1, 2, 3, 4] *Universidade de Uberaba*
hortensiapio@gmail.com / gestor.engenhariaquimica@uniube.br

Resumo

O estudo dos compostos químicos é notório para o homem e seu desenvolvimento, devido à infinidade de aplicações podendo ser usados na conservação dos alimentos, em medicamentos e na fabricação de inúmeras substâncias. Com o desenvolvimento dos métodos de pesquisa, percebeu-se a possibilidade de comprovar que determinadas espécies de plantas exercem influência podendo essa ser positiva ou negativa. Essa influência ocorre através de substâncias chamadas de aleloquímicos e seu estudo possui grande relevância, ao passo que o conhecimento destas, permite a seletividade entre as culturas através de sua utilização na inibição das ervas daninhas e otimização consequente do vegetal alvo. Além disso, possibilita a aplicação no desenvolvimento de pesticidas naturais. Tais substâncias variam de acordo com as espécies de vegetais, diferenciando-se em quantidade e qualidade sofrendo até mesmo a interferência do meio de ocorrência ou ciclo de cultivo. O estudo em questão é chamado alelopatia e dentre as espécies consideradas alelopáticas, o eucalipto tem ganhado inúmeras observações por ter capacidade de produzir substâncias alopáticas vindas do seu metabolismo secundário e por isso, é comumente utilizado nesses estudos.

Palavras-chave: aleloquímico, eucalipto, reações químicas, efeitos alelopáticos.

1-Introdução

O termo alelopatia foi criado em 1937 pelo pesquisador Hans Molish e deriva do grego allelon (de um para outro), pathós (sofrer) que resumidamente quer dizer prejuízo mútuo (FERREIRA & AQUILA, 2000). Correlaciona-se a alelopatia com a capacidade de uma espécie interferir no desenvolvimento de outra de forma natural, através de substâncias químicas conhecidas como aleloquímicos comumente liberadas por exsudação radicular (FORMAGIO, *et al.* 2010).

Com o avançar dos métodos de pesquisa, percebeu-se a possibilidade de comprovar que determinadas espécies de plantas exercem influência no crescimento, desenvolvimento e divisão celular de outras espécies (CÂNDIDO, 2013).

O estudo dos aleloquímicos possui grande relevância ao passo, que o conhecimento dessas substâncias, permite a seletividade entre as culturas permitindo através de sua utilização a inibição das ervas daninhas e otimização consequente do vegetal alvo (MIRÓ, 1998; GOLDFARB, PIMENTEL & PIMENTEL, 2009). Além do mais despertam possibilidades de aplicação em pesticidas naturais (LIMA, PEREIRA & MAPELI, 2007). Sendo um meio natural de controle da cultura infestante sem uso de substâncias sintéticas (PICCOLO, *et al*. 2007).

Segundo Mano (2006), pesquisas sugerem a exploração da alelopatia como alternativas de manejo plantas infestantes, o qual geralmente se faz por meio do uso de herbicidas, o que gera certa preocupação pelo elevado nível de contaminação do solo e dos alimentos. Notoriamente, enxerga-se nos aleloquímicos um recurso eficiente e natural para controle da espécie infestante na agricultura aplicando tais propriedades na confecção de bioerbicidas de forma direta ou otimizada em seu potencial ativo biológico (LIMA, PEREIRA & MAPELI. 2007; FORMAGIO, *et al*. 2010).

O presente trabalho tem o objetivo identificar substâncias capazes de produzir efeitos alelopáticos, através de reações químicas, e testar seus efeitos sobre uma determinada espécie nas várias etapas de desenvolvimento. Além disso objetiva-se enriquecer o conhecimento nessa área de pesquisa e aplica-lo na fabricação de pesticidas e manejo de controle natural (FORMAGIO, *et al.* 2010).

2-Materiais e Métodos

Para os teste de modo geral utilizou extrato obtido de cascas de eucalipto desinfetadas e secas. Para desinfecção lavou-as em água corrente para a total retirada dos resíduos, incubou a amostra em álcool 70% durante 1 minuto e transferiu para solução de hipoclorito de sódio 4% por 4 minutos foi colocada novamente em álcool 70% por 30 segundos e finalmente água destilada. Posteriormente, foi seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 40°C, até umidade constante. Para comparativo realizou o teor de umidade da amostra em base seca (equação 1).

Após a secagem, triturou obtendo-se uma fração de grossos, a qual foi novamente triturada para obtenção de uma fração de finos. Para obtenção dos extratos utilizou-se em média 6,2773 gramas de fração de finos adicionadas a cápsula do extrator Soxhlet (figura 1).

Figura 1: extrator Soxhlet



Fonte: O autor (2016)

A extração procedeu com diferentes solventes, separadamente, em uma em extração contínua e exaustiva à quente: etanol P.A., metanol P.A., hexano P.A. O volume de solvente utilizado foi em média de 250 mL. Após a extração, realizou-se total evaporação do solvente e pesagem. Preparou-se as soluções aquosas nas concentrações 1, 2 e 4% do extrato seco. Para efeito de comparação, utilizou-se água destilada para o teste em branco.

Os feijões para a fase 1 foram umedecidos com água destilada durante o plantio e 6 horas após aplicou-se 1mL de solução em cada recipiente da sementeira e procedeu a aplicação a cada 24 horas na fase 1, nessa utilizou soluções aquosas das frações etanol, metanol nas concentrações de 1, 2 e 4%; já a fração hexano nas concentrações de 1 e 2%, durante três dias. Todas foram classificadas pelo pH através de medição com fita teste. Para os mesmos, realizou-se o teste com oito feijões separados selecionados de forma aleatória. E na fase 2, utilizou feijões previamente cultivados em uma bandeja e condições ambiente e umedecidos com água da rede. Após a emergência, mediu o caule e a radícula (tabela 1) e transferiu para sementeira separadamente e umedeceu com água destilada. Decorrida 6 horas realizou-se a aplicação de 1mL de solução aquosa das frações de etanol e metanol a 2%, realizado em triplicata e posteriormente a cada 24 horas. O mesmo processo para o branco em ambas as fases. A geminação ocorreu em temperatura e condições ambientes durante 5 dias. Os feijões foram previamente lavados e submetidos a desinfecção em álcool 70% por 5 minutos e posteriormente em água destilada e secados antes do plantio.

No último dia os feijões foram observados e classificados de acordo com Regra para análise de sementes (BRASIL, 2009) em: plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), plântulas mortas (PM) e expansão do embrião (EE), ocasionada pela hidratação. E também plântulas que nada sofreram classificadas como (NA) ou nada aconteceu.

Para os ensaios de identificação das substâncias alelopáticas, utilizou-se a metodologia aplicada em Controle de qualidade se ervas medicinais (MOUCO, BERNARDINO & CORNÉLIO; 2003). Seguindo a adaptação da metodologia acima citada: Foram pesadas 2,0g de massa vegetal, adicionou-se 80,0 mL de água destilada. Aqueceu-se até fervura durante

2 minutos. Filtrou-se em papel de filtro procurando manter o pó no fundo do recipiente.

Da solução extrativa utilizou-se alíquotas para as seguintes identificações:

Taninos: reação com cloreto férrico (reação 1)

Colocou 2,0 mL da solução extrativa e adicionou 5,0mL de água destilada e uma gota de cloreto férrico 2%(m/v), escorrendo-o pela parede do tubo. Observou-se a formação de precipitado ou aparecimento de coloração: preta, verde, azul, dependendo do tipo de estrutura química.

Reação com acetato neutro de chumbo (reação 2)

Em um tubo de ensaio colocou 1,0mL da solução extrativa diluída na proporção de 1:5, em seguida adicionou 1 a 2 gotas de solução aquosa de acetato neutro de chumbo a 10%. Observou-se a formação de um precipitado castanho avermelhado volumoso e denso, indicando teste positivo.

Reação com acetato de chumbo e ácido acético glacial (reação 3)

Colocou 3,0mL de solução extrativa e adicionou-se 2,0mL de ácido acético glacial a 10% e 3,0mL de solução de acetato neutro de chumbo a 10%. Aguardou a formação de um precipitado castanho avermelhado indicando a presença de taninos gálicos. A adição de ácido acético impediu a precipitação de taninos catequínicos.

Flavonóides: extração

Pesou 2,0g da massa vegetal, colocou-se em um béquer e adicionou-se 80,0mL de etanol a 75%. Ferveu por aproximadamente 5 minutos. Em seguida resfriou e foi filtrado em papel de filtro.

Reação de Shinodas (reação 4):

Adicionou cerca de 5,0mL do extrato em um tubo de ensaio contendo magnésio metálico, acrescentou-se de 0,5 a 1,0mL de ácido clorídrico. Observou a mudança de coloração para rósea- avermelhada indicando flavonóis, violeta flavanonas e laranja flavonas.

Alcalóides:

Alcalinizou o filtrado obtido anteriormente com solução de hidróxido de amônio (NH_4OH), até atingir um pH entre 9 e 10 (utilizou-se papel tornassol para determinar o pH).

Em seguida, adicionou ao filtrado alcalinizado cerca de 15,0mL de clorofórmio ($CHCl_3$) e agitou para que os alcaloides presentes passe para porção orgânica. Em seguida, colocou cinco gotas de extrato na cápsula de porcelana e levou a uma chapa aquecedora até a secagem. Após secagem dissolveu o resíduo com quatro gotas de solução de HCl 1,5%.

Realizou-se método de identificação reagente de Mayer (reação 5) adicionando algumas gotas sobre o resíduo, observou formação de precipitado volumoso branco.

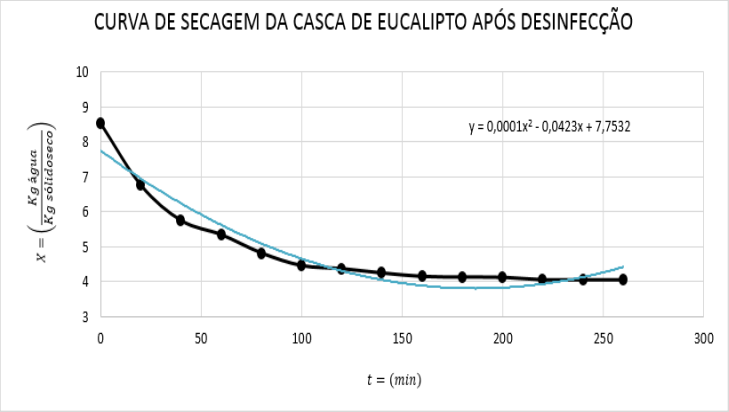
Fenantreno: Reação de Liebermann-Buchard (reação 6)

Adicionou 1,0mL de anidrido acético, transferiu-se para um tubo de ensaio e adicionou 1,0mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo sem agitar. Observou o aparecimento de coloração na zona do contato entre anidrido acético e ácido acético e o ácido sulfúrico (não movimentar o tubo). Cor azul ou verde: provavelmente núcleo esteroidal. Cor vermelha, rosa, púrpura ou violeta: provavelmente núcleo terpênico.

3-Resultados

As amostras secaram a temperatura 40°C em estufa com circulação após desinfecção até alcançar o equilíbrio como descrito no gráfico.

Gráfico 1: curva de secagem



Fonte: O autor (2016)

Para o teor de umidade da amostra bruta o cálculo foi realizado em base seca de acordo com a equação 1:

$$\%BS = \left(\frac{MA}{MS} - 1\right) x\ 100 \qquad (1)$$

Onde:
MA: massa da amostra
MS: massa da amostra seca
BS: base seca

A porcentagem de umidade em base seca foi de 13,0340%.

A medida do caule e da radícula dos feijões da fase 2 foi apresentado na tabela 1:

Tabela 1: Medidas do caule e da radícula

Broto	Medida do Caule (cm)	Medida da Radícula (cm)
1	7	4,5
2	9	11
3	7	11
4	9	9
5	8,5	4
6	7,5	12
7	7	9
8	8,5	5
9	7	11
10	9	11

Fonte: O autor (2016)

As medidas da radículas acompanharam as médias de tamanho considerando a maior.

Após término dos testes obteve-se os dados a seguir, para fase 2, indicados na tabela 2:

Tabela 2: Porcentagem de plantas afetadas classificadas como crescimento normal (CN) e as medidas de caule e radícula

Broto	CN	Medida do Caule (cm)	Medida da Radícula (cm)
Etanol 2%			
1	Sim	17	9,5
2	Não	9	4
3	Sim	21	9,5
Metanol 2%			
4	Sim	25,5	11,5
5	Sim	20	8,5
6	Sim	19,5	12
Branco			
7	Sim	23,5	11,5
8	Sim	22	6
9	Sim	27,5	16
10	Sim	23	16

Fonte: O autor (2016)

Algumas plântulas apresentaram folhas murchas na porcentagem de 33% para etanol e 66% para metanol as a radículas ficaram mais finas em todas testadas. Para o etanol, houve distrofia da radícula em 33% das plântulas testadas.

Para fase 1, considerada a germinação foi determinada a porcentagem do grau de desenvolvimento, indicado na tabela 3:

Tabela 3: Porcentagem do grau de desenvolvimento para cada solução

Soluções*	pH	PN%	PA%	EE%	NA %
Etanol 1%	4	25	62,5	12,5	0
Etanol 2%	4	25	62,5	12,5	0
Etanol 4%	4	37,5	62,5	0	0
Metanol 1%	4	0	62,5	25	12,5
Metanol 2%	4	12,5	75	12,5	0
Metanol 4%	4	50	37,5	0	12,5
Hexano 1%	6	12,5	87,5	0	0
Hexano 2%	5	25	62,5	12,5	0

Fonte: O autor (2016)
*Soluções preparadas a partir do lixiviado seco

O desenvolvimento na fase 1, foi classificado em porcentagem através do número de amostras observadas com determinada característica. As plântulas consideradas normais foram aquelas com presença de broto porém todas essas tiveram crescimento anormal se comparado as amostras cultivadas apenas com água destilada. Já aquelas onde houve expansão radicular considerou-se plântulas com a casca íntegra porém hidratadas e as anormais plântulas com casca escurecida e enrugada, amolecidas ou descaracterizadas.

Para as reações químicas de identificação das substâncias alelopáticas temos a tabela 5 onde R é abreviatura de reação, NA para aquelas reações que não se aplicam e positivo (P) e negativo (N).

Tabela 5: identificação das substâncias alelopáticas

Substância	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Tanino	P*	P	P	NA	NA	NA
Flavonóides	NA	NA	NA	P#	NA	NA

Alcalóides	NA	NA	NA	NA	N	NA
Fenantreno	NA	NA	NA	NA	NA	P[$]

Fonte: O autor (2016)
[*]preto [#]laranja [$]verde

As substâncias alelopáticas identificadas permitem correlacionar efeitos causados na plantas intimamente ligados a alelopatia.

4-Discussão

Considerando o teste qualitativo de substância com efeito alelopáticos através de reações químicas identificou presente de taninos de diversas categorias sendo uma delas os condensados, além de flavonóides da ordem das flavonas e fenantreno de núcleo esteroidal. Essas substâncias são consideradas potenciais para efeitos alelopáticos, sendo que se comparadas com o teste de germinação estão ligados de maneira comprobatória. De modo que os taninos e os flavonoides são polares sugerindo forte presença na solução derivada do etanol e metanol e fenantreno nas soluções derivadas do hexano.

Nos testes da fase 1, as soluções foram classificadas quanto ao pH, que segundo Silveira, Maia & Coelho (2012) *apud* Eberlein (1987), o pH provoca efeitos prejudiciais em suas condições extremas observando prejuízo para as plântulas em condições abaixo de 4 e acima de 10. Os resultados analisados com base nas plântulas anormais demonstrou níveis elevados para as soluções de hexano 1% e metanol 4%, para as demais soluções os índices foram altos e estáveis entre si.

Na fase 1, plântulas normais tiveram crescimento reduzido com relação ao branco, além do que na solução de metanol 1% foi nula. Em 6,25% das plântulas testadas nada aconteceu e em 15,63% houve expansão embrionária.

Na fase 2, houve desenvolvimento de caules porém encurtamento de radícula isso fez com que a parte superior do vegetal perdesse sua capacidade de sustentação.

Para a solução de etanol 2% o crescimento do caule ocorreu de maneira positiva porém bem menor em relação à média do branco. Sendo 16 cm (solução) e 24 cm no branco. As radículas diminuíram com relação ao plantio na média de 1,16 cm e com relação ao branco 4,72 cm.

A solução de metanol 2% as radículas aumentaram na média de 2,34 cm em relação ao plantio e 1,72 cm com relação ao branco. Os caules tiveram crescimento em média de 14 cm com relação ao plantio e 2,33 cm com relação ao branco.

E o branco com seu plantio teve crescimento exponencial considerado normal porém ainda com afinamento de radícula que pode ter sido beneficiado pelo tamanho pequeno da sementeira, porém esse afinamento também foi exponencial entre branco e as soluções de etanol e metanol.

Percebe-se nas soluções atividades negativas nas diversas fases testadas, prejudicando o vegetal em estudo inibindo sua germinação ou afetando partes essenciais para a sobrevivência. De modo a desestruturar o mesmo causando morte ou inibição da germinação.

5-Conclusão

Conclui-se mediante ao presente trabalho a atividade de soluções aquosas das frações em estudo. Considerando os resultados das reações e do teste de germinação tem-se a possibilidade de efeito alelopático por uma das substâncias identificadas e consequentemente a inibição da germinação e prejuízo do crescimento. Através da polaridade de taninos, flavonóides, fenantreno podemos sugerir as soluções que podem estar concentrados e assim concluir que há atividade das mesmas nas diversas etapas testadas.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Regras para a Análise de Sementes.** Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 2009. 365p.
- CÂNDIDO, A. C. da S.; et al. Atividade fito tóxica de Croton doctoris S. Moore. Ciência Rural, v.43, n.4, abr, 2013.

- CARMO, F. M. DA S.; LIMA E BORGES, E. E. DE; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer). **Acta bot. bras**. 21(3): 697-705. 2007.
- EBERLEIN, C. V. Germination of *Sorghum almum* seeds and longevity in soil. **Weed Science**, v. 35, n. 6, p.796-801, 1987. **IN:** SILVEIRA, P. F. DA ; MAIA, S. S. S.; COELHO, M. DE F. B. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de mimosa tenuiflora (willd.) Poir. Na germinação de lactuca sativa l. Biosci. J., Uberlândia, v. 28, n. 3, p. 472-477, May/June. 2012.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição especial.
- FORMAGIO, A. S. N. *et al*. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **R. bras. Bioci**. Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, out./dez. 2010.
- GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnol. & Ciên. Agropec**. João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, fev. 2009
- HERREIRA, R.S. **Alelopatia**. [s. l.]; [s. d.]. Em: https://www.fc.unesp.br/Home/PosGraduacao/MestradoDoutorado/EducacaoparaaCiencia/revistacienciaeeducacao/cen02a12.pdf.
- LIMA, C.; PEREIRA, L. M.; MAPELI, N. C. Potencial alelopático de crotalária, feijão-de-porco e gergelim na germinação e desenvolvimento inicial de picão-preto (Bidens pilosa). Resumos do V CBA - Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. **Rev. Bras. de Agroecologia**; out. 2007 Vol.2 No.2.
- MANO, A. N. R. DE O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (amburana cearensis s.) Sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. Dissertação submetida à coordenação do curso de pós graduação em agronomia, área de concentração em fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre. Fortaleza, 2006.
- MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de Erva-Mate (Ilex Paraguariensis) no desenvolvimento do milho1. **Revista Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.33, n.8, p. 1261-1270, 1998.
- MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 68-73, jul./dez., 2003.
- PICCOLO, G; *et al*. Efeito alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guanxuma. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 381-386, jul./set. 2007.
- TOMAZ, M. A. *et al*. Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Biosci. J**., Uberlândia, v. 30, supplement 2, p. 475-483, Oct. 2014.