

## Allelopathic effect of fatty acid methyl esters from corn and sunflower oils Efeito alelopático dos ésteres metílicos dos ácidos graxos obtidos de óleos de milho e girassol

### Títulos abreviados:

Allelopathic effect of methyl esters from vegetable oils  
Efeito alelopático dos ésteres metílicos de óleos vegetais

Maria Eduarda Amaral Pinto<sup>1</sup>; Nathália Lucca Silva<sup>1</sup>; Ezequias Pessoa de Siqueira<sup>2</sup>;  
Flávio José Leite dos Santos<sup>1</sup>; Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

The fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained from vegetable oils by transesterification reaction. In the present work, the vegetable oils and fatty acid methyl esters were evaluated for allelopathic activity. The main components of the methyl esters were methyl oleate and methyl linoleate, identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Allelopathic activity against seeds of *Lactuca sativa* (lettuce) showed that most of the samples stimulated the growth of root and hypocotyl. However, against seeds of *Allium cepa* (onion), it was revealed that the samples presented higher inhibitory activity for radicle and hypocotyl. Corn oil and its FAME, at a concentration of 1000 µg/mL, showed inhibition greater than 80% for radicle, and percentages higher than 60% for hypocotyl. The corn FAME also inhibited the growth of radicle and hypocotyl more than 50%, at a concentration of 250 µg/mL. For sunflower FAME, the inhibition to the radicle and hypocotyl was inversely proportional to the concentration. The sunflower FAME inhibit radicle and hypocotyl of onion about 60%, at a concentration of 250 µg/mL. Sunflower oil showed greater than 50% inhibition for the radicle, at concentrations of 250 and 1000 µg/mL, and the hypocotyl, at a concentration of 1000 µg/mL.

**Keywords:** allelopathic; fatty acid methyl esters; vegetable oils.

### RESUMO

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram obtidos a partir de óleos vegetais pela reação de transesterificação. No presente estudo, os óleos vegetais e os ésteres metílicos de ácidos graxos foram avaliados quanto à atividade alelopática. Os principais componentes dos ésteres metílicos foram o oleato de metila e o linoleato de metila, identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Para a atividade alelopática frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface), observou-se que a maioria das amostras estimulou o crescimento da radícula e do hipocótilo. Frente às sementes de *Allium cepa* (cebola), foi possível perceber que as amostras apresentaram maior atividade inibitória tanto para radícula, quanto para o hipocótilo. O óleo de milho e seu respectivo FAME, na concentração de 1000 µg/mL apresentou inibição maior que 80% para radícula e, porcentagens superiores a 60% para o hipocótilo. O FAME de milho também inibiu o crescimento da radícula e do hipocótilo em mais de 50%, na concentração de 250 µg/mL. Para o FAME de girassol, a inibição para a radícula e para o hipocótilo foi inversamente proporcional à concentração. O FAME de girassol inibiu a radícula e o hipocótilo da cebola em aproximadamente 60%, na concentração de 250 µg/mL. O óleo de girassol mostrou inibição superior a 50% para a radícula, nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL, e para o hipocótilo, na concentração de 1000 µg/mL.

**Palavras-chave:** alelopático, ésteres metílicos de ácidos graxos, óleos vegetais.

<sup>1</sup> Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, MG, 35501-296, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Belo Horizonte, MG, 30190-002, Brazil.

\* Autor correspondente:

Prof. Dr. Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima

Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei, Rua Sebastião Gonçalves Coelho 400, Chanadour, Divinópolis, 35501-296, MG, Brazil.

Tel.: +55 (37) 3071-1878

Fax.: +55 (37) 3221-1614

E-mail: luarsantos@ufsj.edu.br

O termo alelopatia foi criado em 1937, pelo pesquisador alemão Hans Molisch, referindo-se às interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas, incluindo os microorganismos. Atualmente é empregado para definir os efeitos prejudiciais ou benéficos de uma determinada planta, no desenvolvimento: i) de outra planta da mesma espécie; ii) da mesma planta que os produziu; iii) em plantas de outra espécie; iv) em microrganismo, através de interações bioquímicas. Tais interações ocorrem devido à liberação de substâncias químicas (aleloquímicos) produzidos via metabolismo secundário das plantas (RICE, 1984).

Os agentes alelopáticos são metabólitos secundários e pertencem a várias classes, como terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS; PERES, 2001). Estes compostos podem ser liberados no ar, excretados pela raiz ou carreados até o solo pela água da chuva, que lava as partes aéreas da planta (LARCHER, 2000), interferindo na conservação, na dormência e na germinação das sementes, no crescimento de plântulas e no vigor vegetativo de plantas adultas, podendo também influenciar a competição entre espécies (YAMAGUSHI; GUSMAN; VESTENA, 2011). Os compostos alelopáticos estudados estão se revelando como herbicidas naturais, tendo menos efeitos prejudiciais que os herbicidas sintéticos (MALHEIROS; PERES, 2001). Nesse sentido, nos últimos anos, vários esforços têm sido feitos a fim de identificar propriedades alelopáticas de substâncias, que ofereçam novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de ervas daninhas na agricultura do Brasil e, também, de outros países (SOUZA FILHO; FONSECA; ARRUDA, 2005).

Triacilgliceróis são os componentes mais abundantes dos óleos vegetais, sendo ésteres formados por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos. Os ésteres de ácidos graxos são obtidos comumente através de reações de transesterificação, principalmente ésteres metílicos. Os óleos vegetais apresentam várias atividades biológicas, com destaque para a atividade antimicrobiana, sendo essa atribuída aos ácidos graxos (AGORAMOORTHY et al., 2010), mas estudos sobre ésteres de ácidos graxos, ainda, são muito poucos.

Pelo fato de existirem poucos relatos sobre as atividades biológicas de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade alelopática dos FAMES e dos óleos vegetais que lhes deram origem, assim como comparar essa atividade para as duas classes de compostos.

Os óleos vegetais de girassol e milho foram comprados no mercado local e submetidos à reação de transesterificação, para obtenção dos ésteres metílicos. Em um balão acoplado a um condensador de refluxo, contendo 1 g da amostra, foram adicionados 30 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio 1 mol/L. A mistura foi mantida sob refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi transferida para um funil de separação e extraída com éter etílico. A fase aquosa foi acidificada, utilizando-se solução de ácido clorídrico 1 mol/L e, novamente extraída com éter etílico. A fase orgânica obtida foi, então, transferida para um balão com condensador de refluxo. No balão, foram adicionados 20 mL de hexano e 80 mL de solução metanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% v/v e, a mistura obtida, foi mantida sob refluxo por 1 hora, para a esterificação do material hidrolisado na etapa anterior. Após resfriamento, o material foi transferido para um funil de separação, sendo lavado com 100 mL de solução saturada de NaCl. A camada orgânica separada foi lavada com água e secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após filtração, o solvente foi retirado a vácuo, obtendo-se os ésteres metílicos.

A determinação da composição dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), através da comparação dos tempos de retenção com padrões e, também, pelo padrão de fragmentação encontrado em biblioteca de espectrometria de massas NIST (National Institute of Standards and Technology).

A análise foi feita em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu modelo QP5050A, equipado com coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 mm) e hélio (He) como gás de arraste. A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, aumentando 3 °C/minuto até 140 °C, permanecendo nesta temperatura por 2 min, depois, foi novamente aquecida a uma taxa de 7 °C/min até 300 °C. A temperatura do detector e do injetor foi de 250 °C. O fluxo linear foi de 9,8 mL/min (50 kPa) e Split 1/10. Para cada análise foi injetada 1 mL da amostra no equipamento. A varredura foi de 50 a 500 *m/z*, com uma velocidade de 2 scans. O corte do solvente foi 2,5 minutos. A percentagem de cada composto foi calculada por normalização interna da área do pico cromatográfico.

O ensaio de atividade alelopática foi feito com sementes de dicotiledônea *Lactuca sativa* L. var. repolhuda (alface, Feltrin) e de monocotiledônea *Allium cepa* var. Red Creole (cebola, Topsed Garden). A germinação e o crescimento foram conduzidos em solução tampão MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico]

(Vetec, Brasil) na concentração de 1,95 g/L ajustando ao pH 6,00-6,20 com NaOH 1 mol/L. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) à 0,5%, previamente destilado, e depois diluídas em tampão (5 µL de DMSO/ mL de tampão) e testados nas seguintes concentrações: 1000, 500 e 250 µg/ mL. Foram distribuídas 25 sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) distintamente em placas de petri (90 mm de diâmetro), com papel de filtro Whatman no. 1. Foram adicionados a essas placas de petri, 5 mL de solução tampão contendo as amostras ou 5 mL dos controles (solução tampão sem qualquer amostra testada). O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de petri foram fechadas, lacradas com papel filme e incubadas por sete dias em Câmara de Germinação, no escuro, a 25 °C. Completado esse tempo, as placas foram retiradas e resfriadas a -10 °C durante 24 h para interromper o processo de crescimento. Depois, as placas foram abertas e o comprimento de cada radícula e de cada hipocótilo medidos (VIEIRA et al., 2005).

O efeito sobre o crescimento foram dados como diferenças na porcentagem em relação ao grupo controle e podem ser calculados pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ de crescimento} = [(Ma - Mc) / Mc] \times 100$$

onde Ma é a média dos valores das sementes com as amostras testadas e Mc é a média dos valores para o controle (sementes cultivadas sem adição de amostras testadas). Os dados foram analisados utilizando o Test t de Student, com  $P < 0,05$  como nível de significância, quando comparado ao controle.

A composição dos óleos, na forma de seus ésteres metílicos, foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A análise por CG/EM mostrou que a proporção de ésteres insaturados (88,21-91,98%) foi muito maior do que de ésteres saturados (8,02-11,79%). Os principais ésteres identificados foram oleato de metila e linoleato de metila, sendo ambos ésteres insaturados. Outros ésteres encontrados foram palmitato e estearato de metila (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos ésteres metílicos (FAMES), porcentagens e tempos de retenção (TR).

Compostos	FAME de Girassol		FAME de Milho	
	TR*	%**	TR*	%**
Palmitato de metila	33,12	10,15	33,10	4,40
Estearato de metila	36,21	1,64	36,20	3,62
Oleato de metila	35,93	38,82	35,92	28,86
Linoleato de metila	35,84	49,39	35,85	63,12

\* TR = Tempo de retenção (em minutos), \*\* Concentração em percentual, calculada em relação às áreas normalizadas dos picos.

A atividade alelopática dos óleos de milho e girassol e seus respectivos FAMES foi avaliada frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola). A Figura 1 apresenta os resultados obtidos para esse ensaio. As figuras apresentam o percentual de crescimento da radícula e do hipocótilo das sementes quando submetidas às amostras. As amostras estimularam e inibiram o crescimento do hipocótilo e da radícula das sementes de alface e cebola em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 µg/mL).

Para a atividade alelopática frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface) (Figuras 1A e 1B), observou-se um maior efeito estimulatório no crescimento da radícula e do hipocótilo. Todas as amostras estimularam o crescimento do hipocótilo e da radícula, na concentração de 1000 µg/mL. O óleo de girassol, o óleo de milho e o FAME de girassol tiveram um efeito no crescimento da radícula maior que 20%. Para o hipocótilo, este efeito foi superior a 50% para o FAME de girassol e 35% para o óleo de milho.

Em relação à inibição das sementes de alface, o melhor resultado foi para o óleo de girassol sobre a radícula, na concentração de 500 µg/mL. Portanto, para as sementes de alface não se obteve um perfil homogêneo, visto que os óleos e FAMES conseguiram tanto estimular quanto inibir o crescimento das sementes, em diferentes concentrações. Observando as figuras 1A e 1B, verifica-se que o efeito de estimulação sobre o crescimento foi mais acentuado sobre o hipocótilo quando comparado à radícula. Os resultados obtidos neste ensaio mostraram diferenças estatísticas significantes ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle, exceto pelo óleo de milho e FAME de girassol, na concentração de 500 µg/mL ( $P > 0,05$ ) para a radícula.

Com a realização do teste alelopático frente às sementes de *Allium cepa*

(cebola) (Figuras 1C e 1D), foi possível perceber que as amostras tiveram maior atividade inibitória tanto para radícula quanto para o hipocótilo. O óleo de milho, o FAME de girassol e o FAME de milho inibiram o crescimento da radícula e do hipocótilo em todas as concentrações testadas. Os melhores resultados obtidos no experimento foram para o óleo de milho e seu respectivo FAME, na concentração de 1000 µg/mL, com inibição maior que 80% para radícula e com porcentagens de inibição superiores a 60% para hipocótilo. O FAME de milho também inibiu o crescimento da radícula e do hipocótilo em mais de 50%, na concentração de 250 µg/mL.

Para o FAME de girassol, a inibição para a radícula e para o hipocótilo das sementes de cebola foi inversamente proporcional à concentração, ou seja, quanto maior a concentração, menor a inibição. O FAME de girassol inibiu a radícula e o hipocótilo da cebola em aproximadamente 60%, na concentração de 250 µg/mL. O óleo de girassol apresentou bons resultados quando comparado ao grupo controle, com inibição superior a 50% para a radícula, nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL, e para o hipocótilo, na concentração de 1000 µg/mL.

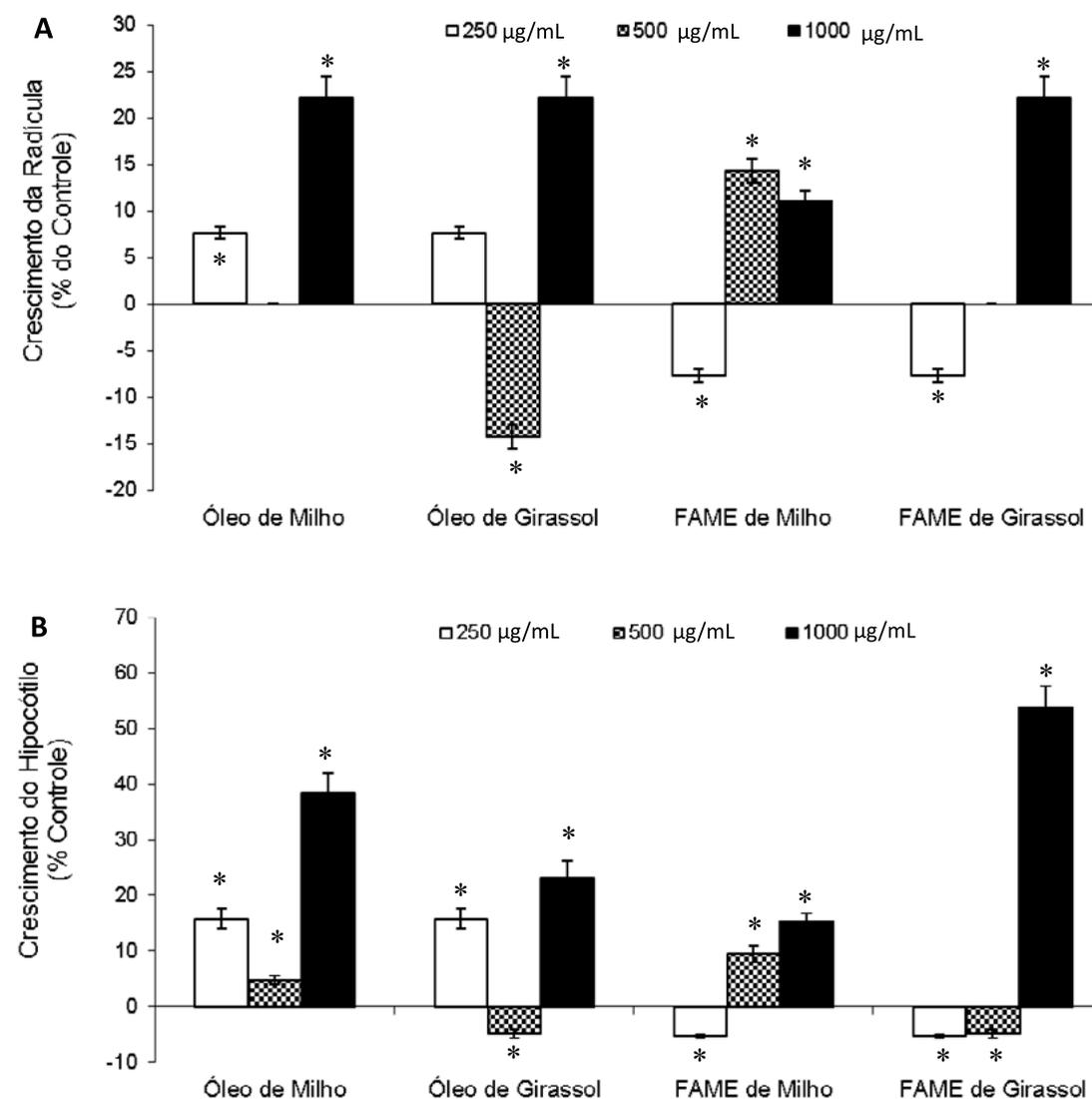
A única amostra que estimulou o crescimento das sementes de cebola foi o óleo de milho, na concentração de 500 µg/mL, sendo este crescimento de aproximadamente 20% para a radícula. Os resultados obtidos neste ensaio mostraram diferenças estatísticas significantes ( $P < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle, exceto pelo óleo de milho, na concentração de 500 µg/mL ( $P > 0,05$ ) para o hipocótilo.

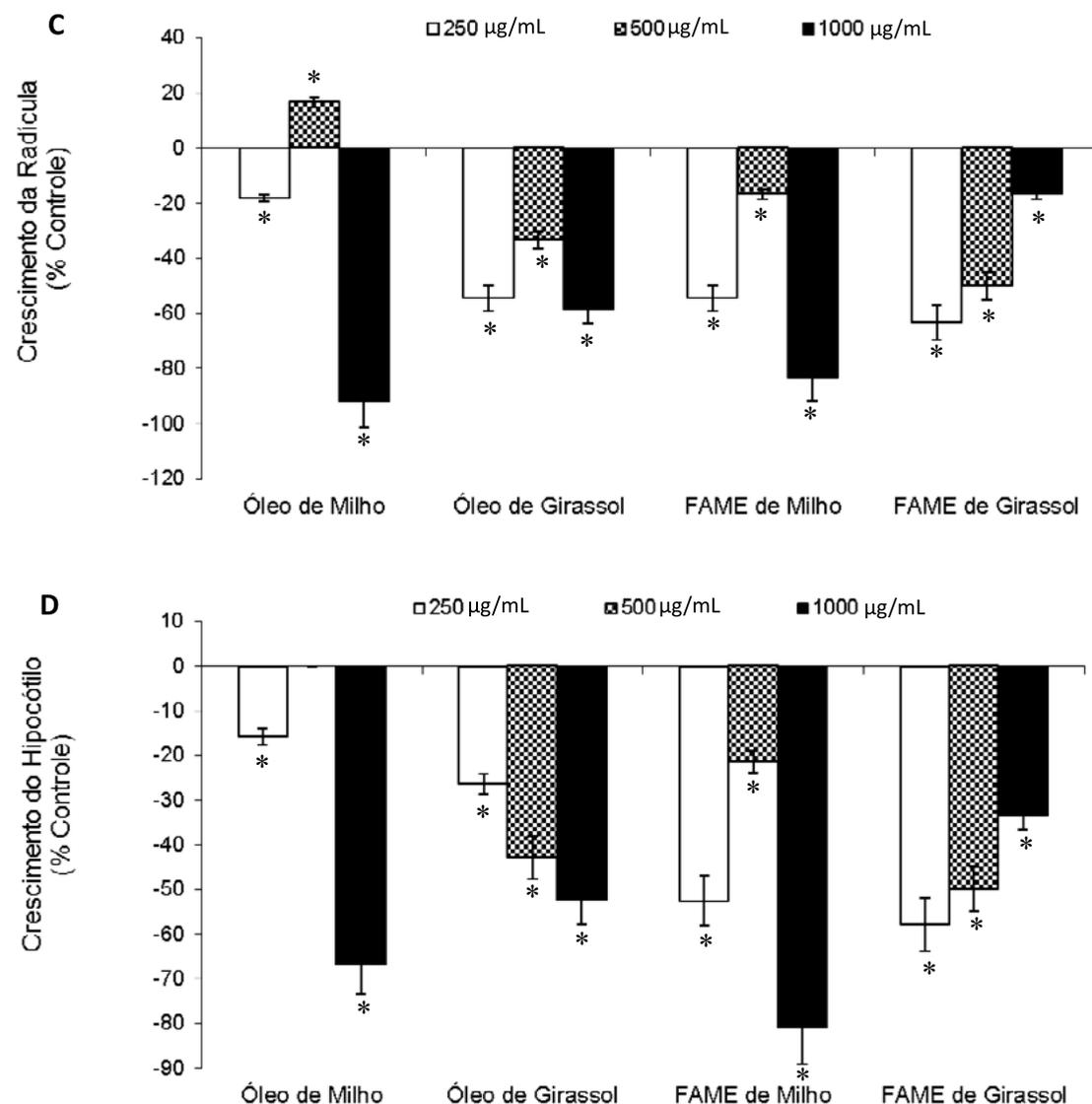
Um estudo demonstrou a atividade fitotóxica de extratos obtidos de *Typha domingensis*, especialmente o extrato obtido com éter etílico sobre as sementes de alface (*Latuca sativa* var. Black Seeded Simpson). Dois ácidos graxos essenciais (ácidos linoleico e linolênico) foram isolados como os componentes majoritários desse extrato, compreendendo mais de 80% (GALLARDO-WILLIAMS et al., 2002). Os compostos isolados dos extratos de *Typha domingensis* são agentes fitotóxicos bem conhecidos, como os ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (ALIOTTA et al., 1990). Dessa forma, sugere-se que o ácido linoleico e o linoleato de metila presentes nos óleos e nos FAMES como compostos majoritários, respectivamente, possam ser os responsáveis pela atividade alelopática das amostras testadas.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que os óleos vegetais e os FAMES apresentaram uma melhor atividade inibitória sobre a radícula e o hipocótilo das sementes de cebola (monocotiledônea) e uma menor

atividade sobre as sementes de alface (dicotiledônea). Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados no sentido de se avaliar a atividade desses compostos sobre outras espécies de sementes para que, futuramente, os óleos vegetais e FAMES possam ter aplicação como herbicidas. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relatando a atividade alelopática dos óleos vegetais de milho e girassol e seus ésteres metílicos.

Figura 1 - Crescimento das sementes quando submetidas às amostras nas concentrações testadas de 250, 500 e 1000 µg/mL para as amostras. A) Radícula da alface; B) Hipocótilo da alface; C) Radícula da cebola; D) Hipocótilo da cebola. Média dos resultados  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.





inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 9, p. 2637-2646, 1990.

GALLARDO-WILLIAMS, M. T.; GEIGER, C. L.; PIDALA, J. A.; MARTIN, D. F. Essential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.). **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 305-308, 2002.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos/SP: Rima, 531p., 2000.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 503-523.

RICE, E. L. **Allelopathy**, 2ª. edição. New York: Academic Press, 422 p., 1984.

SOUZA FILHO, A. P. S.; FONSECA, M. L.; ARRUDA, M. S. P. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 565-573, 2005.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. **Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences**, v. 60, n. 1-2, p. 72-78, 2005.

YAMAGUSHI, M. Q.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Allelopathic effect of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. and of *Casearia sylvestris* Sw. on crops. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1361-1374, 2011.

Received 17 May 2013  
Accepted 19 August 2013

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ) pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

AGORAMOORTHY, G.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V.; HSU, M. J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 739-742, 2007.

ALIOTTA, G.; DELLA GRECA, M.; MONACO, P.; PINTO, G.; POLLIO, A.; PREVITERA, L. *In vitro* algal growth