

Potencial alelopático de *Crinum americanum* L. sob diferentes condições de extração

Allelopathic potential of *Crinum americanum* under different extractions condition

Jose Pedro Nepomuceno Ribeiro^{1*}; Maria Inês Salgueiro Lima²

Resumo

O uso prolongado torna os herbicidas tradicionais cada vez menos eficientes no combate às plantas daninhas. O uso de substâncias naturais extraídas das plantas é uma alternativa eficiente e menos agressiva ao meio ambiente. Os aleloquímicos de muitas espécies são possíveis matérias primas para o desenvolvimento de herbicidas orgânicos. Um dos principais problemas encontrados para a produção desses herbicidas é a obtenção de material botânico em quantidade comercial. Melhorar as técnicas de extração é um passo importante, uma vez que reduz a quantidade de matéria prima necessária. Nesse trabalho foram testados diversos tipos de extrações aquosas de folhas secas de *Crinum americanum* L., uma Amaryllidaceae com forte potencial alelopático. O tempo de extração é pouco importante para o potencial alelopático do extrato. Por outro lado, temperaturas de extração de 40 e 60°C levaram à produção de extratos que inibiram mais eficientemente a germinação. É possível aumentar o potencial alelopático dos extratos utilizando o material vegetal em pó mais de uma vez.

Palavras-chave: Extração. Aleloquímicos. Herbicida natural. Temperatura.

Abstract

The long-term use reduces the efficiency of the traditional herbicides. The use of plant-extracted natural substances is an alternative more efficient and less aggressive to the environment. The allelochemicals of several species are considered to be possible plants for developing an organic herbicide. One of the major problems in this sense is obtaining botanical material in commercial quantities. Improving the extraction techniques is an important step, once it reduces the amount of botanical material needed. In this survey was tested several methods of aqueous extractions of dried leaves of *Crinum americanum* L., an Amaryllidaceae with strong allelopathic properties. The time of extraction is not important for the allelopathic potential of the extracts. On the other hand, when the temperature during extraction was 40 e 60°C, led to extracts with stronger allelopathic potential. It is possible to improve the allelopathic potential using the filtered matter more than once.

Key words: Extractions. Allelochemicals. Natural Herbicide. Temperature.

¹ Aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. E-mail: jpnr@alelopatia.com.br

² Profª Drª do Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. E-mail: ines@power.ufscar.br

* Autor para correspondência

Introdução

Os herbicidas tradicionais estão cada vez menos eficientes no combate as espécies daninhas, uma vez que seu uso vêm selecionando ao longo dos anos variedades resistentes (GELMINI et al., 2001). Esse fenômeno acontece mundialmente e tem levado a uma busca de maneiras mais eficientes no combate às plantas daninhas e menos agressivas ao meio ambiente. Uma dessas maneiras é o uso de substâncias naturais derivadas do metabolismo secundário das plantas. Essas substâncias, denominadas aleloquímicos (RICE, 1984), apresentam uma série de vantagens sobre os compostos sintéticos tradicionais, como maior solubilidade em água, menor toxicidade e menor meia vida (DUKE et al., 2000).

Os aleloquímicos de muitas espécies são considerados possíveis matérias primas para o desenvolvimento de herbicidas orgânicos (RICE, 1995; SOUZA; VIDAL; VIANI, 2002; PICCOLO et al., 2007; DAYAN; CANTRELL, DUKE, 2009). Apesar do grande número de trabalhos sobre o assunto, pouco tem sido feito para tornar viável a sua exploração em escala comercial. Nesse sentido, um dos principais problemas é a obtenção dos aleloquímicos em quantidade, uma vez que boa parte das possíveis espécies doadoras não é cultivada e se distribui de maneira esparsa. Além disso, pouco se sabe sobre a biologia da maioria dessas espécies, e a capacidade de suporte de coleta ou cultivo para a maioria delas permanece uma incógnita.

Existe um vasto número de metodologias para se extrair os aleloquímicos da planta doadora (PUTNAM; WESTON, 1986), e o tipo de solvente, tempos e temperaturas de extração e outros fatores variam a cada trabalho (CRUZ-ORTEGA; AYALA-CORDERO; ANAYA, 2002; SOUZA; VIDAL; VIANI, 2002; MAZZAFERA, 2003; GATTI; ANDRADE PEREZ; LIMA, 2004; WANDSCHEER; PASTORINI, 2008). A extração em si raramente é o foco dos trabalhos que, em geral, tentam avaliar os efeitos dose-resposta

dos extratos de plantas doadoras sobre plantas receptoras. Entretanto, extrações mais eficientes reduzem a quantidade de matéria prima necessária, e são um passo fundamental no desenvolvimento de um herbicida orgânico em escala comercial.

Crinum americanum L. (Amaryllidaceae) possui potencial alelopático, inibindo em laboratório espécies olerícolas e plantas daninhas de culturas (RIBEIRO et al., 2009). Ainda segundo os autores, *C. americanum* é uma espécie rústica, de crescimento rápido e simples de ser cultivada, o que a coloca com possibilidade de planta doadora para o desenvolvimento de herbicidas naturais em escala comercial. Assim, o objetivo do trabalho foi determinar qual a temperatura e o tempo de extração dos aleloquímicos de *C. americanum* L. torna os extratos resultantes mais inibitórios.

Material e Métodos

Tempo de extração - Para avaliar os efeitos do tempo no processo de extração foram misturadas folhas pulverizadas de *C. americanum* em água destilada (peso:peso, 5:95). Essa mistura foi deixada em agitador em temperatura ambiente (cerca de 25°C). Utilizou-se essa proporção por ela ser a mais concentrada que o agitador era capaz homogeneizar. Água foi usada como solvente porque experimentos preliminares (RIBEIRO et al., 2009) demonstraram ser o mais eficiente para extrair os aleloquímicos dessa espécie. Durante 6 horas foram retiradas alíquotas de 200 ml a cada hora, que foram filtradas em papel filtro. Além disso, um extrato de mesma proporção foi colocado em geladeira (cerca de 10°C) e alíquotas de 200 mL foram retiradas na primeira, sexta e vigésima quarta hora.

De todas as alíquotas obtidas foram retiradas sub-alíquotas de 4 mL, e através da relação peso seco/volume foi determinado o rendimento (concentração real) do extrato. O restante foi guardado em geladeira até o início dos bioensaios.

Como não houve diferenças significativas de

rendimento dos extratos entre os diferentes tempos de extração, nem todos os extratos foram usados no bioensaio.

Temperaturas – Para avaliar os efeitos da temperatura na extração dos aleloquímicos foram preparados extratos na mesma proporção descrita para o tempo de extração. Fixou-se o tempo de extração em 1 hora em agitador e extrações a 10°C (geladeira, sem agitador), 25°C (ambiente), 40°C e 60°C. Além disso, foi feita uma extração fervendo o material por 1 hora.

Passado esse tempo, o extrato obtido foi filtrado em papel filtro. Uma alíquota de 4 mL foi separada e, através dela, foi calculado o rendimento do extrato. O restante foi guardado em geladeira até o início dos bioensaios.

Diversas extrações – Para aumentar a eficiência do processo de extração, foi selecionada a combinação de tempo e temperatura mais eficazes com base nos ensaios anteriores (1 hora a 60°C) e feitas mais duas extrações a partir da adição de água, sempre usando a mesma proporção (5:95), à borra já utilizada.

Determinou-se o rendimento dos extratos de cada uma das extrações e guardou-se o restante em geladeira até o início dos bioensaios.

Extrações combinadas – Foram misturados 40 mL de cada extração, totalizando assim 120 mL. Essa mistura foi deixada evaporar em agitador a 60°C até o volume atingir 40 mL. A concentração real do extrato foi determinada para verificar se o rendimento era de fato a soma dos rendimentos das três extrações. Bioensaios foram montados para determinar o potencial alelopático do extrato resultante.

Rendimento – Para determinar o rendimento dos extratos, três alíquotas de 4 mL foram retiradas de cada um deles. Essa alíquotas foram secas à 100°C e a porcentagem de material botânico seco de cada uma delas foi calculado.

Potencial osmótico – Foi medido o potencial

osmótico dos extratos utilizando um osmômetro (μ Osmotte, modelo 5004 automatic osmometer).

Bioensaios - Bioensaios de germinação foram montados com o intuito de verificar se as diferenças dos rendimentos obtidos correspondem às diferenças na capacidade do extrato de inibir a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L).

Todos os ensaios foram realizados em placas de Petri de 9 cm (previamente esterilizadas em microondas) contendo 2 folhas de papel filtro, 5 mL do extrato pertinente e 30 sementes de alface. Nos tempos e temperaturas que mostraram melhores resultados obtidos para a extração combinada foi ensaiado também o extrato diluído em água destilada 1:1. As placas foram lacradas com papel filme para evitar dessecação e então acomodadas em incubadora a 24°C com fotoperíodo de 12h:12h. Foram feitas leituras a cada 24h e sementes com protrusão embrionária visível (FERREIRA; BORGHETTI, 2004) foram consideradas germinadas.

Para todos os tratamentos e controle (com água destilada) foram feitas seis réplicas e os dados foram analisados com o teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn ($P < 0,05$).

Resultados

Tempos de extração – Tanto em temperatura ambiente (25°C) quanto em geladeira (10°C) o tempo não influenciou significativamente o processo de extração, e o rendimento dos extratos em todos os tempos de extração foi bastante similar (Tabela 1). No bioensaio comparando o potencial alelopático dos extratos obtidos também não foram detectadas diferenças significativas entre eles, embora todos tenham potencial inibitório quando comparados ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tempo de extração no rendimento (R), no potencial osmótico (PO, em mOsm) e no potencial alelopático dos extratos de folhas de *Crinum americanum* L. sobre a porcentagem (%) e tempo médio (TM, em horas) de germinação de sementes de alface (*lactuca sativa* L.).

	R (%)	PO	Germinação %	Germinação TM
Controle (água destilada)	-	-	96,1 ^A	26,0 ^A
Temperatura ambiente				
1 hora	1,76 ^A	154	34,4 ^B	61,3 ^B
2 horas	1,54 ^A	-	-	-
3 horas	1,67 ^A	-	-	-
4 horas	1,82 ^A	162	47,3 ^B	64,1 ^B
5 horas	1,97 ^A	-	-	-
6 horas	1,60 ^A	170	39,4 ^B	72,5 ^B
Geladeira				
1 hora	1,46 ^A	165	28,9 ^B	72,2 ^B
6 horas	1,71 ^A	-	-	-
24 horas	1,71 ^A	151	39,4 ^B	65,8 ^B

^ADentro de cada coluna (para Temperatura ambiente e Geladeira separadamente), valores com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn (P<0,05).

Temperatura – A temperatura não influenciou o rendimento dos extratos. Entretanto, o bioensaio mostrou que quanto maior a temperatura de extração, mais eficiente é o extrato no processo de inibição da germinação de sementes de alface (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da temperatura de extração no rendimento (R), no potencial osmótico (PO, em mOsm) e no potencial alelopático dos extratos de folhas de *Crinum americanum* L. sobre a porcentagem (%) e tempo médio (TM, em horas) de germinação de sementes de alface (*lactuca sativa* L.).

	R (%)	PO	Germinação %	Germinação TM
Controle (água destilada)	-	-	96,1 ^A	26,0 ^A
Geladeira (10°C)	1,46 ^A	165	28,9 ^B	72,2 ^B
Ambiente (25°C)	1,54 ^A	185	34,4 ^B	61,3 ^B
40°C	1,81 ^A	190	22,8 ^C	61,5 ^B
60°C	1,67 ^A	191	12,78 ^C	72,0 ^B
Fervido (100 °C)*	1,87 ^A	198	6,67	77,6

^ADentro de cada coluna, valores com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Kruskal -Wallis com pós teste Dunn (P<0,05). *O extrato obtido através da fervura permaneceu turvo e particulado mesmo depois de filtrado, e não foi incluído na análise estatística.

Diversas extrações – A primeira extração retirou a maior parte do material solúvel. O material restante, quase todo extraído pelas próximas duas extrações não foi suficiente para tornar os extratos inibitórios (Tabela 3).

Tabela 3. Rendimento (R), potencial osmótico (PO, em mOsm) e potencial alelopático sobre a porcentagem (%) e tempo médio (TM, em horas) de germinação de sementes de alface (*lactuca sativa* L.) dos extratos feitos de três extrações subseqüentes do mesmo material botânico de *Crinum americanum* L.

	R (%)	PO	Germinação %	Germinação TM
Controle (água destilada)	-	-	96,1 ^A	26,0 ^A
1º Extração	1,72 ^A	186	12,78 ^B	72,0 ^B
2º Extração	0,32 ^B	26	91,1 ^A	29,6 ^A
3º Extração	0,06 ^C	25	96,7 ^A	26,9 ^A

^ADentro de cada coluna, valores com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn (P<0,05).

Extrações combinadas – A combinação das três primeiras extrações é mais inibitória que a primeira extração direta. Esta combinação continuou sendo inibitória, mesmo com metade da concentração (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimento (R), potencial osmótico (PO, em mOsm) e potencial alelopático do extrato combinado de folhas de *Crinum americanum* L. sobre a porcentagem (%) e tempo médio (TM, em horas) de germinação de sementes de alface (*lactuca sativa* L.).

	R (%)	PO	Germinação%	Germinação TM
Controle (água destilada)	-	-	96,1 ^{Aa}	26,0 ^A
24h Geladeira	1,71 ^A	151	39,4 ^B	65,8 ^B
1h a 60°C	1,67 ^A	154	12,78 ^{Cb}	72 ^B
Extração Combinada	2,10 ^B	404	0	-
24h Geladeira/2	0,85 ^A	175	91,7 ^B	51,7 ^B
1h a 60°C/2	0,83 ^A	177	86,67 ^B	53,1 ^B
Extração Combinada/2	1,05 ^B	201	16 ^{Cb}	70,9 ^B

^ADentro de cada coluna, valores com sobrescritos maiúsculos diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn (P<0,05). ^aDentro da coluna %, valores com sobrescrito minúsculo diferentes são estatisticamente diferentes dos outros valores que também tenham sobrescrito minúsculo de acordo com o teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn (P<0,05).

Discussão

É provável que os compostos solúveis em água presentes nas folhas de *C. americanum* tenham atingido o ponto de saturação em um tempo menor que uma hora. Uma vez saturada, a água deixa de solubilizar os compostos, o que explica que não

tenha havido diferença no rendimento e potencial alelopático entre os extratos obtidos nos diferentes tempos de extração.

O aumento da temperatura na extração aumenta a capacidade inibitória dos extratos, mas não aumenta seu rendimento. É provável que isso

aconteça porque temperaturas maiores degradem ou volatilizem um número maior de substâncias, tornando a água insaturada e apta novamente a solubilizar os compostos que não se perderam com o aumento da temperatura. Isso deixaria os extratos com a mesma quantidade material botânico, mas com uma quantidade relativa maior de compostos aleloquímicos. O fato dos extratos de *C. americanum* continuarem inibitórios mesmo fervidos indica que as substâncias aleloquímicas são resistentes à alta temperatura. Estes compostos poderiam ser alcalóides presentes nessa espécie (ALI et al., 1986) e/ou taninos.

A maior parte das substâncias orgânicas não resistem a extrações a quente. Entretanto, uma temperatura de até 60°C na hora da extração é segura para a maioria dos compostos (MELO; RADŪNZ, MELO, 2004), e pode aumentar a eficiência dos extratos.

Existe diferença entre o rendimento da primeira extração e o das outras duas. Isso reflete no potencial alelopático dos extratos, forte na primeira extração e inexistente na segunda e na terceira. Entretanto, a extração combinada teve um rendimento cerca de 20% maior que a primeira extração isolada, o que refletiu em um potencial inibitório significativamente maior. Mesmo quando diluído em água o extrato combinado continuou alelopático, inibindo a germinação das sementes de alface tão eficientemente quando a primeira extração isolada. Isso demonstra que a borra, que é descartada na grande maioria dos ensaios (GATTI; ANDRADEPEREZ; LIMA, 2004; OLIVEIRA; FERREIRA, BORGHETTI, 2004; YANG et al., 2007; AMOO; OJO, STADEN, 2008; GATTI; ANDRADEPEREZ; LIMA, 2008; PEREIRA; SBRISIA, SERRAT, 2008; RIBEIRO et al., 2009) pode ser usada para aumentar o potencial alelopático dos extratos e/ou a quantidade de extrato produzido sem aumentar a quantidade de material botânico utilizado.

O potencial osmótico dos extratos tem um papel

secundário nos resultados encontrados, uma vez que a diferença de potencial osmótico entre os extratos é bastante reduzida.

Assim, com alterações simples na metodologia, é possível produzir extratos significativamente mais inibitórios utilizando a mesma quantidade de material botânico. Embora essa discussão receba críticas quando o enfoque é ecológico (INDERJIT; WESTON, 2000) ela pode trazer contribuições importantes para trabalhos de cunho agrônomo (AMOO; OJO, STADEN, 2008; PEREIRA; SBRISIA; SERRAT, 2008; RIBEIRO et al., 2009).

Conclusões

Tempos de extração superiores a uma hora não influenciam o rendimento do extratos (concentração real), nem no seu potencial alelopático. A temperatura de 60°C no momento da extração aumenta o potencial alelopático do extrato. O material descartado depois da primeira extração pode ser utilizado para aumentar o potencial alelopático do extrato e/ou seu rendimento.

Referências

- ALI, A. A.; SAYED, H. M. E.; ABDALLAH, O. M.; STEGLICH, W. Oxocrine and other alkaloids from *Crinum americanum* L. *Phytochemistry*, Amsterdam, v. 25, n. 10, p. 2399-2401, 1986.
- AMOO, S. O.; OJO, A. U.; STADEN, J. V. Allelopathic potential of *Tetrapleura tetrapectera* leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. *South African Journal of Botany*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 149-152, 2008.
- CRUZ-ORTEGA, R.; AYALA-CORDERO, G.; ANAYA, A. L. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum*, Nova Jersey, v. 116, n. 1, p. 20-27, 2002.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Med. Chem.*, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; RAMAFNANI, J. G. Natural products as sources of

- herbicides: current status and future trends. *Weed Res.*, Nova Jersey, v. 40, n. 1, p. 99-111, 2000.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, RS, 2004. 324 p.
- GATTI, A. B.; ANDRADEPEREZ, S. C. J. G. D.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntz na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Bot. Bras.*, Feira de Santana, BA, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.
- GATTI, A. B.; LIMA, M. I. S.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic potential of *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy J.*, Haryana, v. 21, n. 1, p. 73-82, 2008.
- GELMINI, G. A.; FILHO, R. V.; NOVO, M. D. C. D. S. S.; ADORYAN, M. L. Resistência de biótipos de *Euphorbia Heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. *Bragantia*, Campinas, SP, v. 60, n. 2, p. 93-99, 2001.
- INDERJIT; WESTON, L. A. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *J. of Chem. Eco.*, Nova Iorque, v. 26, n. 9, p. 2111-2117, 2000.
- MAZZAFERA, P. Eleitos alelopáticos do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.
- MELO, E. D. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. D. A. E. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais. *Engenharia na Agricultura*, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 307-315, 2004.
- OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperatura. *Acta Bot. Bras.*, Feira de Santana, BA, v. 18, n. 3, p. 401-406, 2004.
- PEREIRA, B. F.; SBRISSIA, A. F.; SERRAT, B. M. Alelopatia intra-específica de extratos aquosos de folhas e raízes de alfafa na germinação e no crescimento inicial de plântulas de dois materiais de alfafa: crioulo e melhorado. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 38, n. 1, p. 561-564, 2008.
- PICCOLO, G.; ROSA, D. M.; MARQUES, D. S.; MAULI, M. M.; FORTES, A. M. T. Efeitos alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guanxuma. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 3, p. 381-386, 2007.
- PUTNAM, A. R.; WESTON, L. A. *Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems*. Nova Jersey, 1986. 317 p.
- RIBEIRO, J. P. N.; MATSUMOTO, R. S.; TAKAO, L. K.; VOLTARELLI, V. M.; LIMA, M. I. S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 183-188, 2009.
- RICE, E. L. *Allelopathy*. Oklahoma: Editora da Universidade de Oklahoma, 1984. 442 p.
- _____. *Biological control of weeds and plant diseases: advances in applied allelopathy*. Oklahoma: Editora da Universidade de Oklahoma, 1995. 440 p.
- SOUZA, J. R. P. D.; VIDAL, L. H. I.; VIANI, R. A. G. Ação de extratos aquosos e etanólicos de espécies vegetais na germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 2, p. 197-202, 2002.
- WANDSCHEER, A.C. D.; PASTORINI, L. H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 38, n. 4, p. 949-953, 2008.
- YANG, R. Y.; MEI, L. X.; TANG, J. J.; CHEN, X. Allelopathic effects of invasive *Solidago canadensis* L. on germination and growth of native Chinese plant species. *Allelopathy J.*, Haryana, v. 19, n. 1, p. 241-248, 2007.

