

Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia

Sarah Christina Caldas Oliveira^{1,4}, Sonia Cristina Juliano Gualtieri²,
Francisco Antônio Macías Domínguez³, José Maria González Molinillo³ e Rosa Varela Montoya³

Recebido em 5/12/2011. Aceito em 14/05/2012

RESUMO

(Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia). *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil (Solanaceae) é um arbusto típico da região central do Brasil (Cerrado). A atividade alelopática do extrato aquoso de folhas e frutos dessa espécie já foi verificada em estudos anteriores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade alelopática de diferentes extratos de *S. lycocarpum* na germinação e crescimento de quatro espécies-alvo. As folhas foram coletadas, secas e trituradas e submetidas a dois métodos distintos de extração: 1- líquido-líquido (acetato de etila e diclorometano) do extrato aquoso das folhas e 2- com solventes em polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e água) diretamente das folhas. Cada extração foi realizada com equipamento de ultrassom durante uma hora, filtrado e evaporado. Desses extratos, soluções de 800, 400 e 200 ppm foram preparadas, e água e Logran[®] foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Cada solução, bem como os controles, foi dissolvida em DMSO para os bioensaios. As espécies alvo usadas foram: alface, agrião, tomate e cebola. Cada placa era composta de 20 sementes e foi adicionado 1 mL de solução teste com 4 repetições. As placas foram incubadas a 25 °C no escuro. Posteriormente, as plântulas tiveram suas partes aéreas e raízes medidas e a porcentagem de germinação e inibição calculada para cada extrato. Tomate foi a espécie que mostrou maior sensibilidade para todos os extratos, seguido de agrião, cebola e alface. Os extratos que tiveram maior atividade foram o acetato de etila, acetona e as extrações líquido-líquido, indicando as frações que devem conter os princípios ativos da folha dessa espécie.

Palavras-chaves: Alelopatia, Cerrado, lobeira, aleloquímicos e bioensaios

ABSTRACT

(Phytochemistry of *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil (Solanaceae) leaves and their application in allelopathy). *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil (Solanaceae) is a typical shrub in the Cerrado of central Brazil. The allelopathic activity of aqueous extracts of the leaves and fruits of this species has already been proven in previous studies. The goal of this work was to verify the allelopathic activity of different leaf extracts of *S. lycocarpum* on the germination and growth of four target species. The leaves were collected, dried, triturated and submitted to two distinct methods of extraction: 1- liquid-liquid (ethyl acetate and dichloromethane) from the aqueous extract and 2- with solvents of increasing polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol and water) directly from the leaves. Each extraction was made with ultrasound equipment for one hour, filtered and evaporated. From these extracts, solutions of 800, 400 and 200 ppm were prepared, and water and Logran[®] were used as positive and negative controls, respectively. Each solution, as well as the controls, was dissolved in DMSO for the bioassays. The target species used were lettuce, watercress, tomato and onion. To each plate, 20 seeds were added and 1 mL of the tested solutions (with 4 repetitions). The plates were incubated at 25 °C without light, and the shoots and roots of the seedlings were then measured and the percentage of germination and the inhibition of each extract were calculated. Tomato was the most sensitive to the extracts, followed by watercress, onion and lettuce. The extracts with stronger activity were AcOEt, acetone and the liquid-liquid extraction, indicating the fractions that may contain the active principles of the leaves in this species.

Key word: Allelopathy, Cerrado, lobeira, allelochemicals, bioassay

¹ Universidade de Brasília, Faculdade Planaltina, Brasília, DF, Brasil

² Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

³ Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias, Grupo de Alelopatía, Departamento de Química Orgánica, Puerto Real, Cádiz, Spain

⁴ Autor para correspondência: sarahc@unb.br

Introdução

Alelopatia envolve a interação química de plantas e microrganismos tanto em ambientes naturais quanto em sistemas agrícolas. Essa interação se dá devido à liberação no ambiente de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas e microrganismos que podem produzir efeitos positivos ou negativos (Rice 1984; IAS 1996). As formas de liberação dos compostos no ambiente pela planta produtora até atingir a planta receptora pode ser por: volatilização, lixiviação, decomposição e exudação das raízes (Ferreira & Àquila 2000). Existe uma ampla variedade de agentes alelopáticos que são sintetizados e armazenados em diferentes células das plantas, seja na forma livre ou conjugada com outras moléculas e, que são liberadas no ambiente como uma resposta a fatores de estresse biótico e abiótico (Inderjit & Nielsen 2003).

A descoberta de novos aleloquímicos (produtos naturais com atividade biológica) é uma alternativa ao uso de herbicidas convencionais no controle de plantas invasoras. Os herbicidas atuais têm provocado mudanças nas populações de espécies invasoras além do risco de contaminação ambiental e o aumento da resistência a esses compostos (Olofsson & Madsen 2000; Duke *et al.* 2000).

Os estudos com os novos aleloquímicos podem levar à produção de outro tipo de herbicida, quer para uso direto dos compostos descobertos quer como modelos moleculares para síntese de novos agroquímicos (Dias & Dias 2007). Um caso bem descrito é a cinmetilina, um herbicida análogo aos monoterpenos naturais 1,4- e 1,8-cineol (eucaliptol), que apresenta um modo de ação distinto dos herbicidas convencionais, sendo uma alternativa para plantas invasoras que já desenvolveram algum tipo de resistência (Romagni *et al.* 2000). Na busca de novos aleloquímicos, alguns métodos podem ser usados para pesquisar os novos compostos fitotóxicos, tais como o isolamento biodirigido. Este método consiste em realizar bioensaios em cada uma das etapas de isolamento, determinando a (s) fração (ões) testada (s) que apresenta (m) maior atividade biológica. A fração mais ativa é fracionada novamente até a purificação e identificação dos compostos aí presentes, responsáveis pela atividade detectada (Macías *et al.* 2000). Em alguns casos, a atividade pode ser perdida durante o fracionamento por modificações químicas ou degradação e outro evento, não menos importante, é o papel do sinergismo de frações e produtos ativos (Dayan & Duke 2006). Assim, o isolamento biodirigido é uma ferramenta importante no estudo alelopático como uma forma de monitorar todos esses fatores.

Em ambientes naturais, a alelopatia desempenha um importante papel na dominância, sucessão e formação de comunidades vegetais (Chou 1999) além de ser uma das estratégias importantes de colonização de muitas plantas exóticas sobre a comunidade natural (Hierro & Callaway 2003).

O gênero *Solanum* apresenta várias espécies com potencial para estudos de alelopatia. Estas espécies apresentam

uma grande diversidade de compostos químicos, como os glicoalcalóides e glicosídeos esteroides, de atividade alelopática comprovada (Ye *et al.* 2001; Alves *et al.* 2003; Fukuhara *et al.* 2004), flavonas e flavonóides (Silva *et al.* 2003), além de vários hidrocarbonetos, terpenos e ácidos graxos (Aliero *et al.* 2006) e saponinas esteroidais (Zhou *et al.* 2006a). *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) é conhecido popularmente como lobeira ou fruta do lobo e ocorre em alta frequência em ambientes perturbados do bioma Cerrado (Lombardi & Motta Jr. 1993). A atividade alelopática de extratos brutos de folha e fruto já foi estudada em diferentes substratos, como papel (Oliveira *et al.* 2004a; Oliveira *et al.* 2004b) e solo (Aires *et al.* 2005). A composição fitoquímica do fruto é bem conhecida por apresentar propriedades farmacêuticas importantes (Dall'Agnol & Poser 2000; Schwarz *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2008), mas não há trabalhos nessa área com folhas tão pouco com enfoque alelopático.

O presente trabalho teve por objetivo analisar a atividade fitotóxica de extratos orgânicos e aquosos de folhas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil em quatro tipos de sementes.

Material e métodos

As folhas jovens de *S. lycocarpum* foram coletadas no mês de novembro de 2007, na Fazenda Sucupira/EMBRAPA em Brasília-DF, nas coordenadas S15°55'41,8'' W 048°01'47,3' Brasília - Brasil. Durante a coleta as folhas foram colocadas em sacos de papel e consideradas como folhas jovens aquelas coletadas acima do segundo nó de cada ramo. Estas foram secas em estufa de circulação forçada até peso constante a 50 °C e em seguida trituradas com auxílio de um liquidificador produzindo um pó que foi embaladas à vácuo até seu processamento no Laboratório de Alelopatia na Universidade de Cádiz, Espanha, com licença do Instituto Brasileiro do Meio ambiente e Recursos Naturais Renováveis-IBAMA Nº 07BR001206/DF.

Para a identificação das substâncias químicas, com atividade alelopática presentes nas folhas de lobeira, foram realizados dois tipos de extração: uma que constituiu na obtenção de extratos a partir do pó das folhas utilizando solventes orgânicos diretamente com polaridade crescente e outra onde primeiramente foi preparado um extrato aquoso do pó das folhas e este, em seguida, foi fracionado líquido-líquido.

O pó das folhas jovens de lobeira apresentou melhor atividade nos bioensaios realizados previamente e por isso foi eleito para identificação dos seus compostos. Nesta extração utilizou-se um total de 120 g de pó de folha. A extração foi realizada em potes de vidro com tampa onde cada 30 g de pó era extraído com 300 mL de solvente na proporção de 1:10. Este era mantido em banho de ultrassom por um período de 1 hora. O ultrassom foi escolhido como método de extração devido a duas razões previamente testadas: o menor tempo de exposição do material vegetal com o solvente e pelo maior rendimento

chegando ao dobro do método de extração comum de 24h sob agitação. Trabalhos como os de Albu *et al.* (2004) e Rostagno *et al.* (2003) usaram com sucesso o ultrassom na extração de compostos secundários com a melhoria do rendimento. Depois do período de uma hora, o extrato foi filtrado em funil de Büchner com papel de poro 0,22µm acoplado a uma bomba a vácuo e depois evaporado em rotavapor. Essa extração se repetiu duas vezes para cada solvente orgânico. Os solventes orgânicos utilizados foram: Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH).

Para o fracionamento líquido-líquido, utilizou-se 348g do pó da folha que foi extraído inicialmente em água destilada na proporção 1:10 em ultrassom durante 1 hora. Em seguida, o extrato foi filtrado à vácuo com filtro de papel de 0,22 µm de poro e evaporado em rotavapor. O extrato obtido foi pesado (m = 42,09 g) e posteriormente foi dissolvido em 200 mL de água e colocado em um funil de separação de 1000 mL. Em seguida foi adicionado 200 mL de diclorometano que foi levemente agitado para evitar a formação de emulsões durante esse processo. A mistura foi deixada em um suporte para separação das fases e o solvente orgânico retirado. No fracionamento com diclorometano essa operação foi repetida 8 vezes. Em seguida, foi adicionado acetato de etila e repetido o mesmo procedimento descrito para diclorometano, a diferença foi o número de repetições do processo que foram 5. O critério usado para escolha do número de repetição do processo de fracionamento a limpeza do líquido.

O bioensaio utilizado para verificar o efeito fitotóxico dos extratos de folha de lobeira foi de sementes de espécies alvos padrão, conhecidas com STS (*Standard Target Species*). Neste bioensaio, foram utilizados 26 mg de cada um dos extratos e frações obtidas e descritas anteriormente. A essa quantidade foi adicionado Dimetilsofóxido (DMSO) numa proporção de 5 µL/mL e preparadas soluções de 800, 400 e 200 ppm da cada extrato e frações a serem testadas.

Para bioensaio com sementes utilizou-se quatro espécies modelo sendo as dicotiledôneas agrião (*Lepidium sativum* L. – Cruciferae), alface (*Lactuca sativa* L. – Asteraceae) e tomate (*Solanum lycopersicum* L. – Solanaceae). Além destas, foi incluída a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L. – Alliaceae) a qual é representante de família de plantas invasoras de culturas de interesse agrícola. Este bioensaio realizou-se com quatro repetições, em placa de Petri (4 cm de diâmetro) sobre papel Whatman nº 1 como substrato onde foram adicionadas 20 sementes por placa. A germinação e o crescimento ocorreram em solução aquosa, tamponada mediante o uso de solução de 10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) e 1M de NaOH com pH=5,6. O volume de solução para cada placa de Petri foi de 1 mL. Quando se adicionou as sementes e as soluções dos compostos a serem testados nas placas, estas foram seladas com Parafilm® e incubadas em câmara de crescimento Memmert IC 700 com ausência de luz, sob

25 °C. As placas foram mantidas nessas condições durante quatro, cinco, seis e sete dias, respectivamente, para as sementes de agrião, tomate, alface e cebola. Decorridos os períodos de crescimento acima mencionados, as placas foram armazenadas a -10 °C durante 24 horas para cessar o crescimento das plântulas. O congelamento favoreceu a manipulação das plântulas, evitando torções tanto nas radículas como na parte aérea, além disso, permitiu que as medições pudessem ser realizadas em dias distintos. Uma vez descongeladas e esticadas, utilizou-se o programa FITOMED® para realizar as medições dos parâmetros de longitude da raiz e da parte aérea.

Neste bioensaio utilizou-se como controle positivo o herbicida comercial com atividade conhecida LOGRAN®. Os valores obtidos para cada um dos parâmetros considerados (porcentagem de germinação e comprimento da raiz e parte aérea) foram comparados com o controle negativo que continha somente a solução tampão com DMSO.

O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição segundo a fórmula abaixo:

$$\%inibição = \left(\frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) \times 100\%$$

Onde $\bar{x}t$ é a média de alongamento dos tratamentos e $\bar{x}c$ a média de alongamento do controle. Os parâmetros avaliados foram à porcentagem de germinação de sementes germinadas por placas e o comprimento da raiz e da parte aérea. Para germinação, a distribuição das variáveis é o número de sementes por placa e para a raiz e parte aérea, a distribuição empregada foram às medidas de cada variável em cada placa, conhecida como distribuição de médias. Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (branco) e mostrados em gráfico de barras. O valor “0” representa o controle. Qualquer valor positivo implica em estimulação dos parâmetros medidos e os valores negativos inibição. As médias foram então submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas entre si pelo teste de comparação de média Tukey 5% através do programa SISVAR®.

Resultados e discussão

A massa total dos extratos obtidas a partir da extração direta com solventes (que serão chamados de extratos) e fracionamento líquido-líquido (que serão chamados de frações) são representadas na Fig. 1. O extrato aquoso (que deu origem as frações) e o metanólico foram os que tiveram maior rendimento se comparado com as outras extrações e fracionamentos. Isso porque grande parte dos açúcares e produtos glicosilados presentes no pó da folha são extraídos nesses dois solventes.

Para melhor análise dos dados, a avaliação do efeito fitotóxico dos extratos e frações das folhas trituradas de lobeira foram separados em germinação e crescimento.

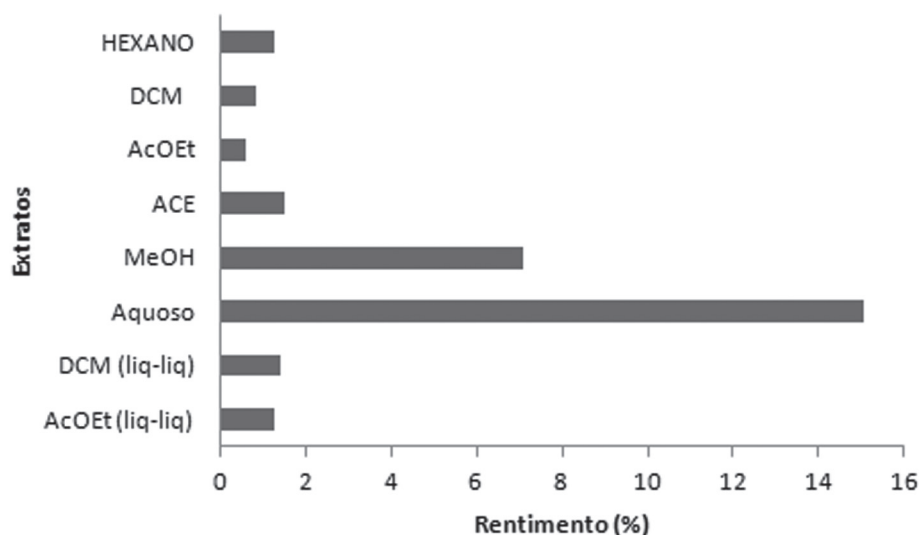


Figura 1. Rendimento em porcentagem dos extratos do pó das folhas de *S. lycocarpum*. Fracionamento líquido-líquido de acetato de etila -AcOEt (liq-liq)- e diclorometano -DCM (liq-liq); extrações diretamente das folhas aquoso, metanol (MeOH), Acetona (ACE) Acetato de etila (AcOEt), Diclorometano (DCM) e Hexano.

Efeito na Germinação

Em relação aos bioensaios com sementes de agrião, três extratos e uma fração se mostraram ativos na inibição da germinação em relação ao controle, sendo elas: extrato de AcOEt, ACE, MeOH e a fração de AcOEt (Fig. 2). Deve se notar nesses resultados a alta atividade que a fração AcO-ET causou na inibição da porcentagem de germinação de sementes de agrião em relação ao controle. Essa inibição alcançou os 85% na concentração de 400 ppm, inibição maior que o próprio herbicida Logran[®]. Essa inibição elevada, que fugiu do padrão de resposta dose-dependente da concentração, pode ter sido causada por um problema de solubilidade da fração em água que possivelmente alterou a concentração original pela presença de material em suspensão. Mesmo com o uso do DMSO e o ultrassom, essas frações e/ou extratos de baixa polaridade apresentava uma dificuldade na sua solubilização no tampão usado no bioensaio.

As sementes de agrião germinam uniformemente e em um curto intervalo de tempo o que facilita a otimização de bioensaios para os estudos de fitotoxicidade utilizando essa espécie, o que torna uma espécie interessante para uso nos bioensaios, além disso, e é uma das espécies sugeridas por Macías (2000) como espécies alvo na padronização de bioensaios. Em outros trabalhos, sementes de agrião também mostraram sensíveis a outros aleloquímicos (Hasegawa *et al.* 1992; Kato-Noguchi *et al.* 2002).

As sementes de tomate demonstraram maior sensibilidade na germinação em relação aos compostos presentes nos extratos e frações da folha de lobeira (Fig. 3). As duas frações produziram uma alta inibição da germinação das sementes de tomate, mesmo na menor concentração (200ppm). Essa inibição foi superior a 80% em relação ao controle, maior do que a causada pelo herbicida Logran[®].

Os outros extratos apresentaram uma inibição crescente na seguinte sequência; ACE, AcOEt e DCM numa relação dose-dependente da concentração. O extrato que chamou a atenção foi o de MeOH que apresentou uma inversão nessa relação dose-dependente da concentração.

Sementes de tomate têm sido utilizadas em bioensaios de alelopatia como espécies alvo com êxito (El-Khatib *et al.* 2004; Manoel *et al.* 2009). Wandscheer & Pastorini (2008) utilizaram sementes de alface e tomate como espécies alvo em experimento e as sementes de tomate mostraram menos sensíveis do que as sementes de alface, tradicionalmente utilizadas em bioensaio de alelopatia. Tomate é da mesma família e gênero da lobeira, e essa sensibilidade maior dessa semente aos extratos do pó da folha poderia ser um indicador de efeito autotóxico desse extrato para os membros do mesmo gênero.

Usualmente, a espécie alvo mais empregada nos ensaios alelopáticos é a alface. Essa tem sido usada extensivamente devido a sua germinação rápida e alta sensibilidade a diversos extratos e produtos (Macías *et al.*, 2000). Para os extratos e frações do pó da folha de lobeira este fato não foi observado na germinação (Fig.4). A germinação destas sementes não foi afetada significativamente pela presença dos extratos e frações indicando uma baixa sensibilidade aos compostos presentes se comparado com sementes de tomate (Fig. 3).

O efeito do extrato na germinação em sementes de cebola não foi observado em nenhum dos tratamentos, inclusive do herbicida Logran[®] (Fig. 5). Essa espécie é uma monocotiledônea assim como um grande número de plantas invasoras, e a sua germinação não sofreu influência dos compostos presentes no pó da folha de lobeira. As sementes de cebola também são usadas como espécie alvo para ensaios

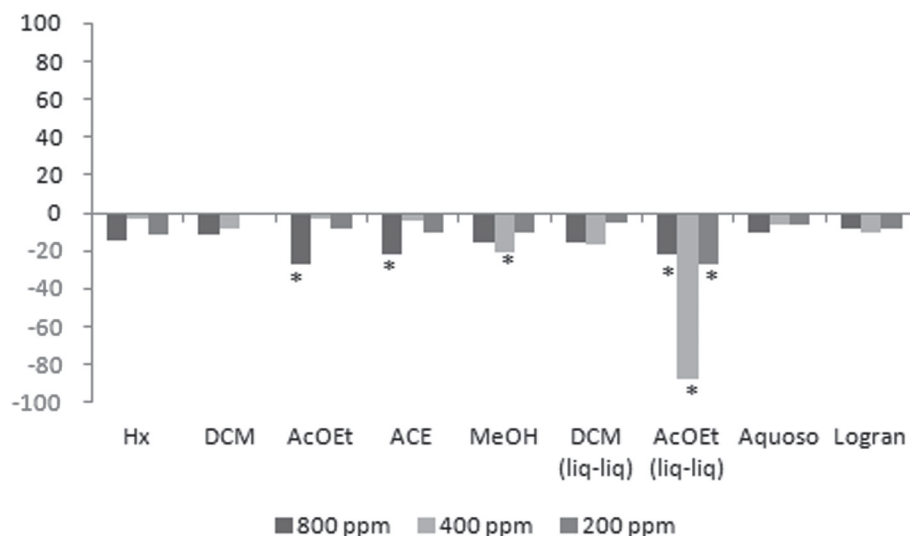


Figura 2. Inibição da germinação de sementes agrião (*Lepidium sativum* L.) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante quatro dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran®. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

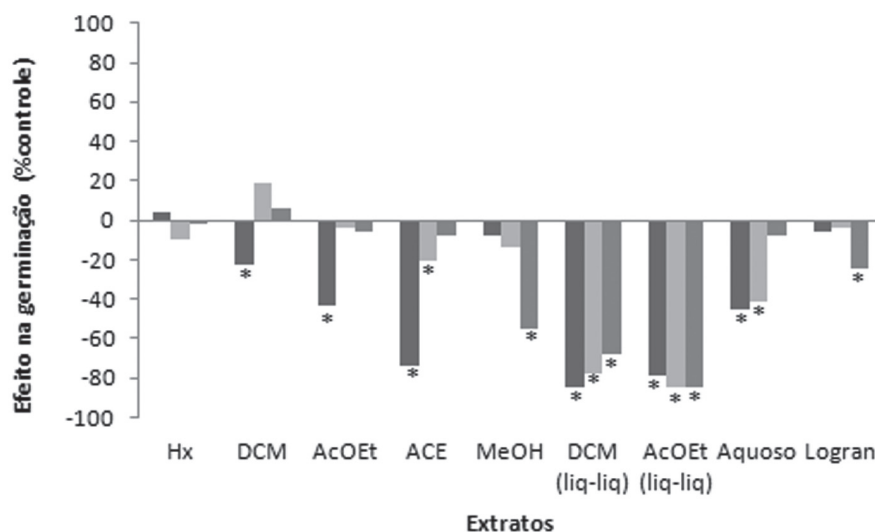


Figura 3. Inibição da germinação de sementes tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante cinco dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran®. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

alelopáticos (Abdelgaleil & Hashinaga 2007). Parvez *et al.* (2004) testou várias espécies agrônômicas na atividade alelopática de casca e sementes de *Tamarindus indica* L. Entre todas as espécies avaliadas, a cebola se mostrou a menos sensível, mostrando mais uma vez a pouca sensibilidade dessa espécie, uma vez que os mesmos extratos inibiram significativamente outras sete espécies de plantas invasoras utilizadas como alvo.

Em relação às espécies alvo utilizadas, tomate foi a mais sensível, quando se analisou o efeito na germinação. As sementes de agrião foram menos sensíveis e, as sementes de alface e cebola mostraram-se insensíveis aos extratos e frações do pó das folhas de lobeira.

Dentre os extratos e frações testados, analisando apenas a semente que foi afetada (tomate), as frações foram as mais ativas, melhor até que o herbicida Logran®. Essas frações são

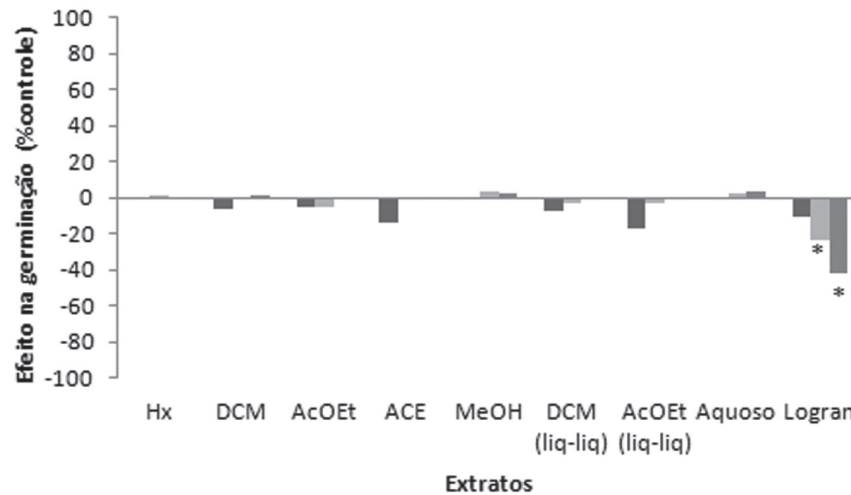


Figura 4. Inibição da germinação de sementes alface (*Lactuca sativa* L.) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante seis dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran*. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

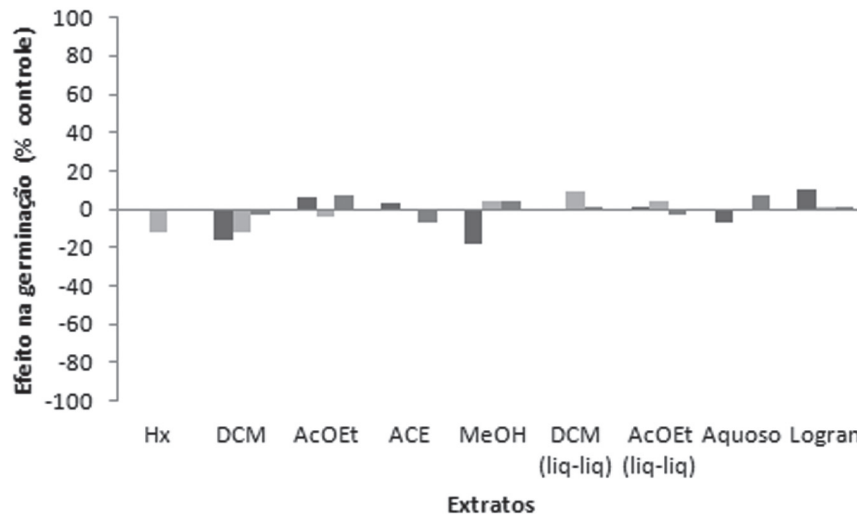


Figura 5. Inibição da germinação de sementes cebola (*Allium cepa* L.) sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*) durante sete dias de crescimento (25 °C/escuro): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran*. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

então as recomendadas para seguir a marcha de purificação e identificação dos compostos presentes.

O número final de sementes germinadas, no caso aqui avaliado a germinabilidade, é um parâmetro normalmente pouco sensível a presença de aleloquímicos. Para que a germinação ocorra é necessário apenas água, oxigênio e temperatura adequados uma vez que nenhuma das espécies estudadas apresentava algum tipo de dormência. Vale

lembrar que o parâmetro de germinação adotado nesse trabalho foi de protrusão da radícula com pelo menos 2 mm. O tempo médio de germinação é um parâmetro mais sensível à presença de aleloquímicos porque muitos deles permitem que a semente germine, mas com um pequeno atraso, seja devido à presença de aleloquímicos com essa função seja pelo efeito osmótico dos extratos (Oliveira *et al.* 2004a, b).

A germinação de sementes é amplamente utilizada nos bioensaios alelopáticos e, na literatura o uso desse bioensaio é em geral adequado para determinação da atividade alelopática entre espécies como tem sido citado por Leather & Einhelling (1986), Inderjit (1995) e Romeo & Weidenhamer (1988). Muitos trabalhos são centrados em poucas plantas, especialmente sementes de espécies agrícolas para descobrir aspectos bioquímicos e fisiológicos da germinação. Por essa razão, a questão é como estender os resultados obtidos em laboratório com sementes selecionadas pela mão humana e este poder ser extrapolado para plantas nativas e em condições de campo (Aliotta *et al.* 2006).

Efeito no crescimento

As plântulas de agrião apresentaram maior inibição no crescimento da raiz e parte aérea se comparado com a germinação, algo já bem relatado nos experimentos de

alelopatia (Gatti, *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004a, b) (Fig. 6). No crescimento da parte radicular os extratos que se mostraram com melhor atividade foram acetato de etila, acetona e a fração acetato líquido-líquido. Já na parte aérea, a sensibilidade foi maior e os extratos mais ativos foram acetona e metanol, bem como as frações diclorometano e acetato de etila líquido líquido. A maior sensibilidade da parte aérea do agrião em relação à parte radicular pode ser observada nos extratos e frações em baixa concentração havendo estímulo de crescimento em alguns tratamentos. As inibições do crescimento da parte aérea por extratos e frações mais ativos foram expressivas se comparadas com o efeito observado pelo herbicida Logran[®] mostrando uma sensibilidade dessa espécie aos aleloquímicos presentes.

Um efeito fitotóxico mais acentuado foi registrado em tomate (Fig. 7). As frações apresentaram inibições maiores que o herbicida Logran[®] mesmo em baixas concentrações

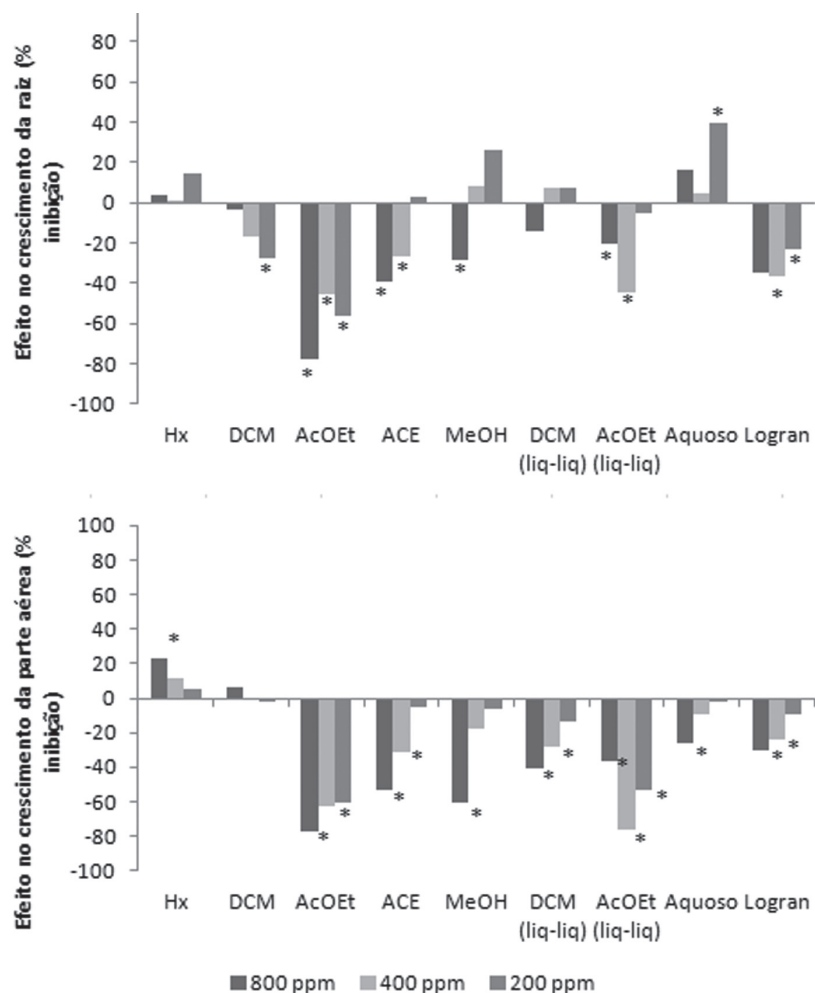


Figura 6. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de agrião crescidas durante quatro dias sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran[®]. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

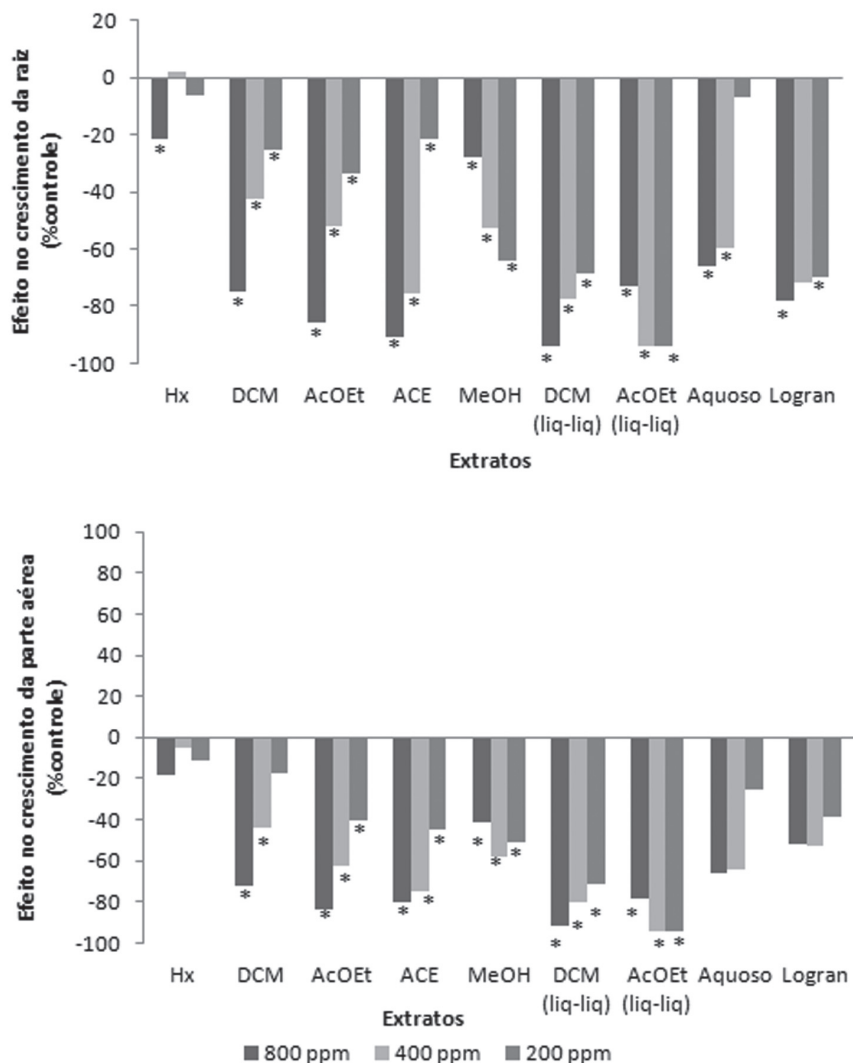


Figura 7. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de tomate crescidas durante cinco dias sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran*. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

para o crescimento da parte radicular. As partes aéreas e radiculares das plântulas de tomate sofreram inibição na presença da maioria dos extratos, exceto o extrato hexânico.

O efeito produzido pelo extrato MeOH na germinação e no crescimento da raiz foi algo que chamou a atenção, uma vez que se observou maior efeito inibitório em baixa concentração do extrato. O extrato MeOH é o mais estudado na fitoquímica do gênero *Solanum* (Ye *et al.* 2001; Fukuhara *et al.* 2004; Nakamura *et al.* 2008) sendo os produtos mais encontrados nesses extratos os glicosídeos esteroidais e os glicoalcaloides. Esse comportamento inverso do efeito dose-dependente da concentração pode estar relacionado à dificuldade de absorção dos compostos presentes nesse extrato em altas concentrações. Já nas concentrações mais baixas a absorção dos

aleloquímicos teria melhor eficiência e com isso, um maior efeito inibitório.

Mesmo que em vários trabalhos tenham demonstrado sensibilidade de sementes de alface aos aleloquímicos (Alves *et al.* 2004; Gatti *et al.* 2004; Maraschin-Silva & Aquila 2006; França *et al.* 2008), esse comportamento não foi observado para os extratos e frações provenientes de folha de lobeira (Fig. 8). Isso ressalta a importância do uso de várias espécies vegetais para averiguar a atividade fitotóxica, uma vez que elas podem apresentar sensibilidade variada de acordo com o tipo de extrato. Mesmo que a inibição em sementes de alface tenha sido menor, fica evidente que a raiz é o órgão mais atingido pela presença dos extratos.

Muitos trabalhos também evidenciaram que as raízes são mais sensíveis aos aleloquímicos quando comparadas

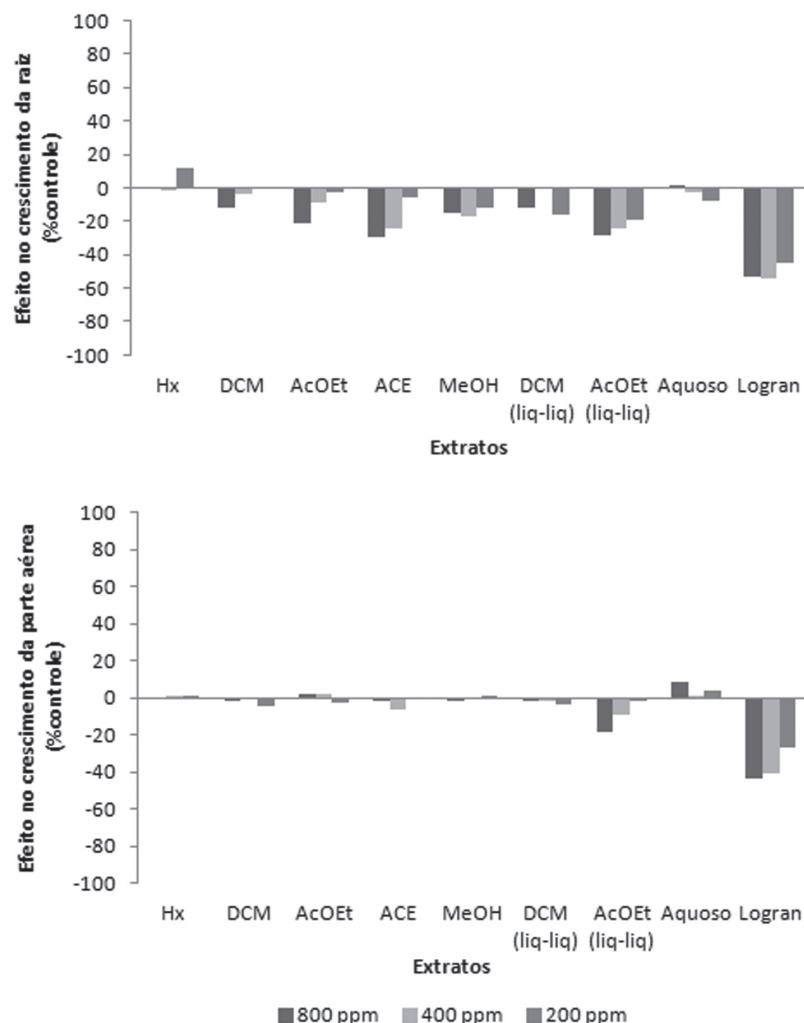


Figura 8. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aérea das plântulas de alfaca crescidas durante seis dias sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran. * indica diferenças significativas em relação ao controle

com a parte aérea das plantas (Abdelgaleil & Hashinaga 2007; Ercoli *et al.* 2007; Parvez *et al.* 2003; Punjani *et al.* 2006). Além disso, em ambiente de Cerrado, possuir um sistema radicular em bom funcionamento é uma forma de garantir a sobrevivência em um ambiente com escassez de água durante parte do ano e sendo assim, as plantas afetadas por compostos produzidos pela folha de lobeira podem ter seu estabelecimento comprometido neste ambiente. Os extratos mais ativos para inibição do crescimento da raiz foram AcOEt, ACE e MeOH.

Em cebola, o extrato de AcOEt e a fração de AcOEt mostrou-se mais ativo na inibição do crescimento da parte radicular e DCM, ACE e as duas frações afetaram o crescimento da parte aérea (Fig. 9). Assim como para germinação, as plântulas de cebola também demonstraram pouca sensibilidade aos extratos e frações da folha de lobeira.

Essa espécie é um representante das monocotiledôneas e as gramíneas são dominantes no extrato sub-arbustivo, onde normalmente ocorre esta espécie (observação pessoal). Esse resultado reforça essa observação, indicando a pouca influência alelopática das folhas para espécies de monocotiledôneas, o que mostra uma seletividade dos extratos e frações quanto ao seu modo de ação.

Embora a germinação da semente, em condições de campo, possa garantir o estabelecimento das espécies, o estágio de plântula é o período mais susceptível à influência de fatores externos como a influência dos aleloquímicos (Fenner 2000; Adkins *et al.* 2007).

O efeito inibitório mais expressivo em sementes de tomate, tanto na germinação quanto no crescimento, mostrou um possível efeito autotóxico desses extratos dentro do mesmo gênero. Evidências de autotoxicidade foram

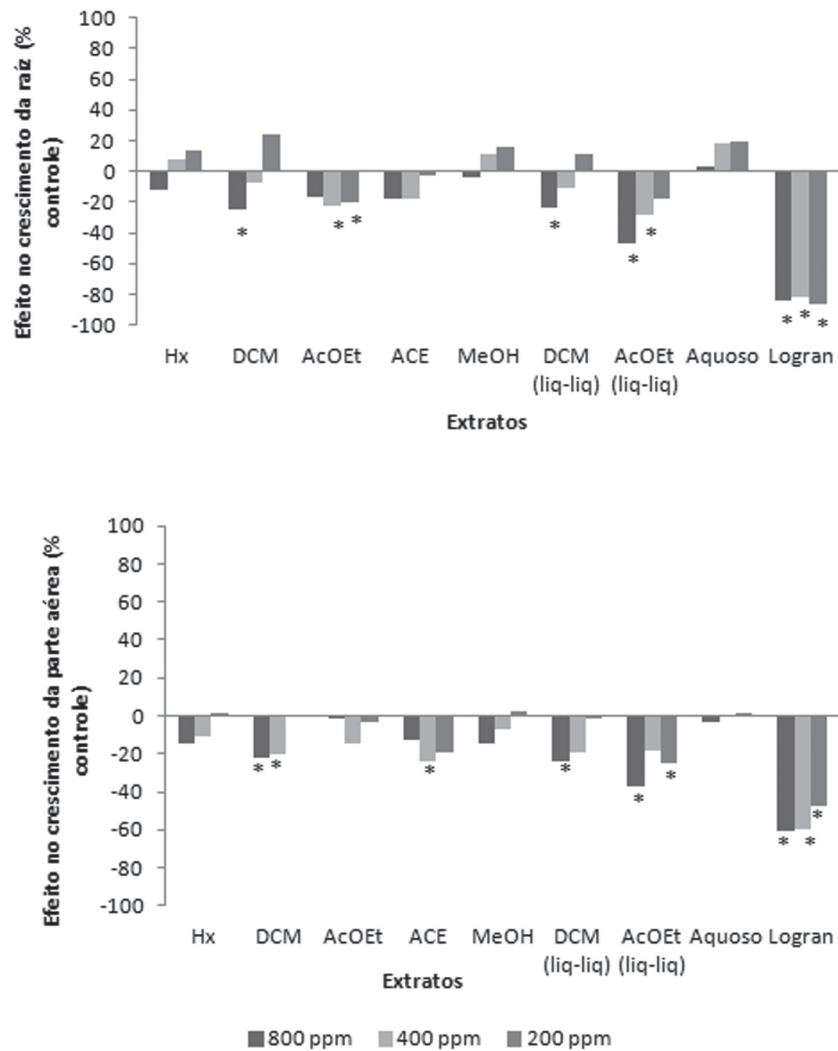


Figura 9. Porcentagem de inibição e/ou estímulo do crescimento das raízes e parte aéreas das plântulas de cebola crescidas durante sete dias sob influência dos extratos e frações do pó da folha de lobeira (*S. lycocarpum*): extrato Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE) e Metanol (MeOH). As frações líquido-líquido: Diclorometano (DCM liq-liq), Acetato de etila (AcOEt liq-liq) e aquoso. Herbicida comercial Logran[®]. * indica diferenças significativas em relação ao controle

relatadas inicialmente em 1907 onde se verificou que raízes de trigo, aveia e outras plantas cultivadas liberavam compostos químicos que inibiam suas próprias plântulas (Shereiner & Reed 1907 *apud* Wu *et al.* 2007). Desde então a autotoxicidade tem sido observada para muitas culturas agrícolas como alfafa (Hedge & Miller 1990), arroz (Chou & Chou 1979), cevada (Oueslati *et al.* 2005) e trigo (Young *et al.* 1989) e tem sido uma ferramenta importante para o planejamento de uma rotação de cultura.

O significado ecológico da autotoxicidade está envolvido na distribuição geográfica, adaptação para induzir dormência e prevenção da mortalidade de sementes e propágulos (Friedman & Waller 1983). Em ambientes naturais também há evidência de autotoxicidade o que mostra uma forma eficiente de um autocontrole populacional inibindo a germinação e o crescimento inicial de plântulas (Álias

et al. 2006; Everin & Wetzel 2000; Perry *et al.* 2005). Na silvicultura autotoxinas da liteira e do húmus inibe o restabelecimento de várias coníferas de importância econômica como *Picea abies* e *Cunninghamia lanceolata* (Chen *et al.* 2005; Mallik 2002). Em vários casos a autotoxina inibe o crescimento de plantas junto com outros fatores como patógenos e, a importância ecológica da autotoxicidade varia espacialmente e temporariamente (Wu *et al.* 2007; Sinkkonen 2007).

O efeito dos extratos e frações aqui estudados podem ser devido a várias alterações provocadas pelos aleloquímicos em diversos processos fisiológicos ao mesmo tempo, o que dificulta separar os efeitos primários e secundários desses compostos presentes em extratos e frações da folha de lobeira. Há um aumento das evidências de que os aleloquímicos podem agir em diversas frentes como a divisão celular, dife-

renciação celular, absorção de águas e íons, balanço hídrico, metabolismos dos fitohormônios, respiração, fotossíntese, funcionamento enzimático, transdução de sinal bem como a expressão gênica (Singh & Thapar 2003; Inderjit & Duke 2003; Belz & Hurlle 2004). É possível que os aleloquímicos tenham produzido um ou mais efeitos no processo celular que tenha resultado na redução do crescimento. Todavia, o detalhamento dos mecanismos bioquímicos pelos quais um composto age no seu efeito tóxico no crescimento vegetal não são bem conhecidos (Zhou & Yu 2006).

Agradecimento

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Abdelgaleil, S. & Hashinaga, F. 2007. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. **Biochemical Systematics and Ecology** 35(11): 737-742.
- Adkins, S.; Ashmore, S. & Navie, S. 2007. **Seeds: biology, development and ecology**. Cambridge, CAB International.
- Aires, S.S.; Ferreira, A.G. & Borghetti, F. 2005. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botanica Brasílica** 19(2): 339-344.
- Albu, S.; Joyce, E.; Paniwnyk, L.; Lorimer, J. & Mason, T. 2004. Potencial for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry** 11: 261-265.
- Alías, J.; Sosa, T.; Escudero, J. & Chaves, N. 2006. Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. **Plant and Soil** 282: 327-332.
- Aliero, A.; Asekun, O.; Grierson, D. & Afolayan, A. 2006. Chemical composition of the hexane extract from the leaves of *Solanum pseudocapsicum*. **Asian Journal of Plant Sciences** 5(6): 1054-1056.
- Aliotta, G.; Cafiero, G. & Otero, A. 2006. Weed germination, seedling growth and their lesson for allelopathy in agriculture. Pp. 285-297. In: Reigosa, M.; Pedrol, N. & González, L. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Springer.
- Alves, C.C.; Alves, J.M.; Silva, T.M.; Carvalho, M.G. & Neto, J.J. 2003. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente** 10(1): 93-97.
- Alves, M.d.; Filho, S.M.; Innecco, R. & Torres, S.B. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira** 39(11): 1083-1086.
- Belz, R.G. & Hurlle, K. 2004. A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. **Journal of Chemical Ecology** 30(1): 175-198.
- Chen, L.; Wang, S. & Yu, X. 2005. Effects of phenolics on seedling growth and N-15 nitrate absorption of *Cunninghamia lanceolata*. **Allelopathy Journal** 15: 57-65.
- Chou, C.H. 1999. Role of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Review in Plant Sciences** 18: 609-636.
- Chou, C. & Chou, S. 1979. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa*. II. Effects of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on rice productivity. **Journal of Chemical Ecology** 5: 839-859.
- Dall'Agnol, R. & Poser, G. 2000. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology** 71: 337-341.
- Dias, L. & Dias, A. 2007. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias** 30(1): 510-517.
- Duke, S.; Dayan, R.; Romagni, J. & Rimando, A. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research** 40: 99-111.
- El-Khatib, A.; Hegazy, A. & Galal, H. 2004. Allelopathy in the rhizosphere and amended soil of *Chenopodium murale* L. **Weed Biology and Management** 4: 35-42.
- Ercoli, L.; Masoni, A.; Pampana, S. & Arduini, I. 2007. Allelopathic effects of rye, brown mustard and hairy vetch on redroot pigweed common jambsquar and knotweed. **Allelopathy Journal** 19(1): 249-256.
- Ervin, G. & Wetzel, R. 2000. Allelochemical autotoxicity in the emergent wetland macrophyte *Juncus effusus* (Juncaceae). **American Journal of Botany** 87: 852-860.
- Fenner, M. 2000. **Seeds-The Ecology of regeneration in plant communities**. New York, Cambridge university Press.
- Ferreira, A. & Áquila, M. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 175-204.
- França, A.C.; Souza, I.F.; Santos, C.C.; Oliveira, E.Q. & Martinotto, C. 2008. Atividade alelopática de nim sobre o crescimento do sorgo, alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia** 32(5): 1374-1379.
- Friedman, J. & Waller, G. 1983. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee *Coffea arabica* L. **Journal of Chemical Ecology** 9: 1099-1106.
- Fukuhara, K.; Shimizu, K. & Kubo, I. 2004. Arudonine, and allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. **Phytochemistry** 65: 1283-1286.
- Gatti, A.B.; Perez, S.C. & Lima, M.I. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia eschscholae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica** 18(3): 459-472.
- Hasegawa, K.; Mizutani, J.; Kosemura, S. & Yamamura, S. 1992. Isolation and identification of Lepidimolide, a new allelopathic substance from mucilage of germinated cress seeds. **Plant Physiology** 100: 1059-1061.
- Hedge, R. & Miller, D. 1990. Allelopathy and autotoxicity in alfalfa: characterization and effects of preceding crops and residue incorporation. **Crop Science** 30: 1255-1259.
- Hierro, J.L. & Callaway, R.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil** 256: 29-39.
- IAS. 1996. International Allelopathy Society Constitution. **First World Congress on Allelopathy. A Science for the Future**. Cádiz, Universidad de Cádiz.
- Inderjit. 1995. On laboratory bioassay. **Botanical Review** 61(1): 28-44.
- Inderjit & Duke, S. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta** 217: 529-539.
- Inderjit & Nielsen, E. 2003. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. **Critical Reviews in Plant Sciences** 22(3-4): 221-238.
- Kato-Noguchi, H.; Ino, T.; Sata, N. & Yamamura, S. 2002. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. **Physiologia Plantarum** 115(3): 401-405.
- Leather, G. & Einhellig, F. 1986. A bioassay in the study of allelopathy. In: Putman, A. & Tang, C. **The Science of Allelopathy**. New York, Wiley-Interscience.
- Lombardi, J. & Motta Jr., J. 1993. Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). **Ciência e Cultura** 45: 126-127.
- Macías, F.A.; Castellano, D. & Molinillo, J.M. 2000. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48: 2512-2521.
- Mallik, A. 2002. On the question of paradigm in the science of allelopathy. Pp. 289-297. In: Reigosa, M. & Pedrol, N. **Allelopathy: from molecules to ecosystems**. Enfield, Science Publishers.
- Manoel, D.D.; Ferrari, T. & Ferreira, G. 2009. Atividade alelopática de extratos frescos e seco de folhas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) (Coville) e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de tomate. **Semina: Ciências Agrárias** 30(1): 63-70.
- Maraschin-Silva, F. & Áquila, M.E. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasílica** 20(1): 61-69.

- Nakamura, S.; Hongo, M.; Sugimoto, S.; Matsuda, H. & Yoshikawa, M. 2008. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, "fruta do lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry** **69**: 1565-1572.
- Oliveira, S.C.; Ferreira, A.G. & Borghetti, F. 2004. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasilica** **18**(3): 401-406.
- Oliveira, S.C.; Ferreira, A.G. & Borghetti, F. 2004. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. **Allelopathy Journal** **13**(2): 201-210.
- Olofsson, M. & Madsen, B.E. 2000. Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): global implication for weedy rice and weed management. **Annals of Applied Biology** **137**: 279-295.
- Oueslati, O.; Ben-Hammouda, M.; Ghorbal, M.; Guezah, M. & Kremer, R. 2005. Barley autotoxicity as influenced by varietal and seasonal variation. **Journal of Agronomy and Crop Science** **191**: 249-254.
- Parvez, S.; Parvez, M. & Fujii, Y.G. 2003. Allelopathy competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. **Plant Growth Regulation** **41**: 139-148.
- Parvez, S.; Parvez, M.; Fujii, Y. & Gemma, H. 2004. Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica*. **Plant Growth Regulation** **42**: 245-252.
- Perry, L.; Thelen, G.; Ridenour, W.; Weir, T. & Callaway, R. 2005. Dual role for an allelochemical: (+) catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. **Journal of Ecology** **93**: 1126-1135.
- Punjani, B.; Patel, K. & Pantel, U. 2006. Allelopathic influence of *Prosopis cineraria* leaf extracts on germination and seedling growth of rice. **Allelopathy Journal** **18**(2): 339-344.
- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy** (2a ed.). New York, Academic Press.
- Romagni, J.; Duke, S. & Dayan, R. 2000. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. **Plant Physiology** **123**: 725-732.
- Romeo, J. & Weidenhamer, J. 1998. Bioassay for allelopathy in terrestrial plants. Pp. 179-209. In: Haynes, K. & Millar, J. **Methods in Chemical Ecology**. Norwell, Kluwer Academic Publishing.
- Rostagno, M.; Palma, M. & Barroso, C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A** **1012**: 119-128.
- Schwarz, A.; Pinto, E.; Haraguchi, M.; Oliveira, C.A.; Bernardi, M.M. & Spinoso, H.d. 2007. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy research** **21**: 1025-1023.
- Silva, T.; Carvalho, M. & Braz-Filho, R. 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova** **26**(4):517-522.
- Singh, H. & Thapar, R. 2003. Allelopathic influence of *Cannaia sativa* on growth and metabolism of *Parthenium hysterophorus*. **Allelopathy Journal** **12**: 61-70.
- Sinkkonen, A. 2007. Modelling the effect of autotoxicity on density-dependent phytotoxicity. **Journal of Theoretical Biology** **244**: 218-227.
- Wandscheer, A. & Pastorini, L. 2008. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural** **38**(4): 949-953.
- Wu, H.; Pratley, J.; Lemerle, D.; An, M. & Liu, D. 2007. Autotoxicity of wheat (*Triticum aestivum* L.) as determined by laboratory bioassays. **Plant Soil** **296**: 85-93.
- Ye, W.-C.; Wang, H.; Zhao, S.-X. & Che, C.-T. 2001. Steroidal glycoside and glycoalkaloid from *Solanum lyratum*. **Biochemical Systematics and Ecology** **29**(4): 421-423.
- Young, C. & Thorne, R.W. 1989. Phytotoxic potential of soil and wheat straw in rice rotation cropping systems of subtropical Taiwan. **Plant Soil** **120**: 95-101.
- Zhou, X.; He, X.; Wang, G.; Gao, H.; Zhou, G.; Ye, W. & Yao X. 2006. Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products** **69**: 1158-1163.
- Zhou, Y. & Yu, J. 2006. Allelochemicals and photosynthesis. Pp. 127-139. In: Reigosa M.; Pedrol, N. & Gonzáles, L. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Springer.