Extrato aquoso de *Crotalaria juncea* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Ocimum basilicum*

Marli de Moraes Gomes[1*], **José Roberto Pinto de Souza**[1], **Eli Carlos de Oliveira**[1]
[1]*Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, 86057-970, Londrina, Brasil*
**Autor para correspondência: marlimoraes06@hotmail.com*

RESUMO: Objetivou-se avaliar o potencial alelopático de diferentes concentrações de extratos aquosos de crotalária (*Crotalaria juncea*), preparados por infusão e maceração, sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum*), bem como, identificar e quantificar os possíveis compostos fenólicos. Os extratos aquosos foram preparados por infusão e maceração através da mistura de 100 g de material vegetal seco e moído com 1000 ml de água destilada, e a partir deste foram feitas as diluições em água destilada, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% e um controle (água destilada). Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x5 (dois métodos de preparo e cinco concentrações) com quatro repetições. Os testes foram realizados em laboratório e casa de vegetação utilizando-se como espécie receptora o manjericão. Foram avaliados o pH, o potencial osmótico, identificados e quantificados os compostos fenólicos dos extratos. Utilizou-se 50 sementes de manjericão por repetição em caixas plásticas com duas folhas de papel filtro umedecidas com as concentrações dos extratos. Em casa de vegetação, 20 sementes de manjericão foram semeadas por caixa de polietileno com a mistura de solo e areia (2:1 v/v), e umedecido com os extratos de diferentes concentrações na quantidade equivalente a 200 ml por caixa. Foram analisados: percentual de germinação e emergência, índice de velocidade de germinação e emergência, comprimento da parte aérea e da radícula, massa seca total de plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os extratos aquosos de crotalária inibiram a germinação e crescimento inicial de manjericão nas concentrações de 75 e 100%. Foram identificados e quantificados os compostos fenólicos: ácido gálico (20,63 µg/g), ácido ferúlico (10,74 µg/g) e ácido cinâmico (1,36 µg/g).
Palavras- chave: crotalária, alelopatia, planta de cobertura, *Ocimum basilicum*

ABSTRACT: Aqueous extract of *Crotalaria juncea* on germination and initial growth of *Ocimum basilicum*. This study aimed to evaluate the allelopatic potential of aqueous extracts of sunn hemp (*Crotalaria juncea*), prepared by infusion and maceration, under the germination and the initial growth of basil (*Ocimum basilicum*) plantlets, as well as identify and quantify the phenolic compounds. The concentrated aqueous express was prepared by infusion and maceration through the mixture of 100 g of dry and grinded plant material with 100 ml of distilled water, and from those the dilutions in distilled water were made, in the concentrations of 25, 50, 75 and 100% and a control. The treatments were arranged in a factorial scheme 2x5 (two preparation methods and five concentrations) with four repetitions. The tests were performed in the laboratory and green house. Were evaluated the pH, the osmotic potential, identified and quantified the phenolic compounds of the extracts. 50 seeds of basil were used for each repetition which were placed in plastic boxes with two paper leafs dampened with the concentrations of the extracts. The trial in the green house, 20 seeds of basil were seeded by each polyethylene box with the mixture of sand and soil (2:1 v/v) and dampened with the extracts with 200 ml per box. Were analyzed: percentage of germinated and emerged, germination and emergence velocity indexes, length of aerial part and root, total dry mass of plantlets. The data were submitted to an analysis of variance and the means compared by Tukey test (5%). The obtained results indicated that the sunn hemp aqueous extracts inhibited the germination and initial growth of basil in the 100 and 75% concentrations. Were identified and quantified the phenolic compounds: galic acid (20,63 µg/g), ferulic acid (10,74 µg/g) and cinnamic acid (1,36 µg/g).
Keywords: *Crotalaria juncea*, allelopathy, cover crop, *Ocimum basilicum*

Recebido para publicação em 25/01/2018
Aceito para publicação em 17/02/2022
Data de publicação em 23/02/2022
ISSN 1983-084X

https://doi.org/10.70151/yppjj694

© 2020 **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**/Brazilian Journal of Medicinal Plants.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

INTRODUÇÃO

Crotalaria juncea L. destaca-se entre as espécies leguminosas utilizadas como adubo verde ou cobertura morta do solo. Apresenta ampla adaptação às regiões tropicais, capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e potencial de produção de biomassa. Além disso, é considerada uma espécie alvo de pesquisas por possuir em sua composição, princípios químicos expressivos no controle de plantas invasoras e fitonematoides (Marshall et al. 2002; Carvalho et al. 2004).

A produção de hortaliças como plantas condimentares, aromáticas, e medicinais pode ser beneficiada com a utilização de plantas de cobertura, uma vez que, o Ministério da Agricultura recomenda o cultivo orgânico para essas espécies, considerando a tendência mundial de busca por produtos naturais e a manutenção de suas características químicas (Campos e Campos 2012).

Entre elas, o manjericão (*Ocimum basilicum* L.) destaca-se por ser largamente cultivado em diversos países, devido à sua importância econômica como condimento (Teixeira et al. 2002; Carovic-Stanko et al. 2010) e para a extração de óleo essencial, a partir de folhas e ápices com inflorescências para obtenção do linalol, utilizado na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (Bozin et al. 2006; Martins et al. 2010; Favorito et al. 2011).

O plantio direto é visto como uma prática conservacionista capaz de favorecer a produção de hortaliças com menor emprego de agroquímicos. No entanto, o sucesso de sua implantação depende da escolha da espécie vegetal, pois, no processo de decomposição, algumas delas podem por meio da liberação de substâncias alelopáticas, prejudicarem o desenvolvimento e até mesmo inibir microrganismos e a germinação de outras espécies, entre elas, plantas cultivadas (Ferreira et al. 2008; De Conti e Franco 2011; Gomes et al. 2013). As substâncias alelopáticas são oriundas do metabolismo secundário das plantas e, entre os compostos, os fenólicos compreendem o maior grupo identificado (Carmo et al. 2007; Taiz e Zeiger 2013).

Estudos sobre efeitos alelopáticos de resíduos vegetais são realizados, geralmente, por meio de bioensaios laboratoriais que utilizam extratos aquosos e espécies bioindicadoras sensíveis, e os processos utilizados são a extração a frio, através de maceração e a quente, através de infusão (Ferreira e Aquila 2000; Falkenberg et al. 2003; Falkenberg et al. 2003).

Em consequência de seus efeitos alelopáticos, o extrato aquoso de *C. juncea* reduziu a germinação da *Lactuca sativa* L. e de *Bidens pilosa* L. em 89,6% e 35,5% respectivamente (Teixeira et al. 2004). Os extratos dos adubos verdes, entre eles, a crotalária, na concentração de 10% reduziram o percentual de germinação de *L. sativa* em 40% (Erasmo 2004). Por outro lado, a aplicação do extrato aquoso de crotalária e sua incorporação no solo inibiu a infecção de fitonematoides em mudas de tomate e reduziu em 51% das populações de *M. javanica* e *M. incognita* em áreas de cultivo de alface e repolho (Moraes et al. 2006; Garrido et al. 2008).

Apesar de muitos estudos relacionados à crotalária, o conhecimento dos seus efeitos alelopáticos sobre hortaliças e seus compostos fenólicos ainda é incipiente no Brasil, principalmente relacionado às espécies com potencial medicinal, como o manjericão. É importante a realização de pesquisas nesse sentido, tanto para o conhecimento da relação entre as espécies, quanto para o planejamento de implantação das técnicas de plantio direto e adubação verde nos sistemas de produção. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial alelopático de concentrações de extratos aquosos de *C. juncea*, preparados por infusão e maceração, sobre a germinação e o crescimento inicial de manjericão (*O. basilicum*), bem como, identificar e quantificar os compostos fenólicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados ensaios em laboratório e casa de vegetação na Universidade Estadual de Londrina, PR. Para obtenção do material vegetal, realizou-se a coleta das plantas de crotalária no período de florescimento. O material composto por caule, folhas e flores foi retirado com auxílio de uma tesoura de poda e seco em estufa a 40 °C, até obter-se massa seca estável, e após, triturado em moinho tipo Willey (peneira de 20 mesh).

A partir do material vegetal seco e moído foi preparado o extrato aquoso pelos métodos de extração: maceração e infusão. Para obtenção do extrato por maceração, em um recipiente de vidro, adicionou-se 100 g do material triturado e 1000 ml de água destilada (25 °C). Para a infusão, adicionou-se 100 g do material triturado e 1000 ml de água destilada previamente aquecida até o início de fervura (100 °C). Os recipientes foram agitados manualmente por um minuto e mantidos em repouso por 24 h à temperatura ambiente, no escuro. Após, passadas em filtro de pano de algodão para obter-se o extrato concentrado (100%) ou solução padrão. Os tratamentos utilizados constaram de diluições das soluções padrão com a adição de água destilada para obter as concentrações de 25, 50 e 75%, e o tratamento controle com água destilada (0%).

Como espécie teste foram utilizadas se-

mentes de manjericão (*O. basilicum*), variedade Alfavaca Basilicão (ISLA Sementes®), adquiridas no comércio local, sem tratamento químico e com percentual germinativo de 93% e pureza 95%.

Os extratos foram avaliados quanto ao pH e o potencial osmótico determinado pelo método de Chardakov (Borella et al. 2009) em triplicata. Apresentaram valores de pH entre 6,05 e 6,30, e 6,20 para o controle, o potencial osmótico variou entre -0,0278 a -0,0330 Mpa, caracterizados dento da faixa favorável à germinação e/ou ao crescimento inicial do manjericão. Foram realizados bioensaios de laboratório dispostos em delineamento inteiramente casualizado, e de casa de vegetação em blocos casualizados, ambos com quatro repetições. Avaliaram-se os seguintes parâmetros:

Germinação: quatro repetições de 50 sementes de manjericão foram colocadas para germinar em caixas plásticas (11x11x3,5 cm) forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada (testemunha) e com as concentrações dos extratos na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Acondicionadas em câmara de germinação à temperatura alternada de 20 e 30 °C, fotoperíodo de 12 h durante 14 dias (Brasil 2009). Consideraram-se plântulas anormais aquelas que não apresentaram algumas das estruturas, como raiz ou parte aérea, ou deformidades em alguma das estruturas, como raiz escurecida. Juntamente com a germinação, foi determinado o índice de velocidade de germinação (Maguire 1962) com contagens diárias durante 14 dias.

Comprimento de radícula e da parte aérea: conduzido da mesma forma que o teste de germinação. Ao final do período do teste foi avaliado aleatoriamente com o auxílio de régua milimetrada o comprimento do hipocótilo e da raiz de 20 plântulas por repetição, e os resultados expressos em centímetros (cm).

Massa seca total de plântulas: determinada a partir da massa seca de 20 plântulas utilizadas para o comprimento. Colocadas em sacos de papel, e mantidas em estufa (50 °C) até a obtenção de massa constante (48 h). Após foram pesadas em balança analítica de precisão de 0,0001 g (Shimadzu AY 220) e os resultados expressos em gramas (g).

Emergência: semeou-se manualmente 20 sementes de manjericão em caixas de polietileno (40x25x10cm) contendo uma mistura de solo e areia (2:1 v/v). O substrato foi umedecido com 200 ml água e após 30 min receberam 200 ml dos extratos de crotalária e o controle com água destilada. As caixas permaneceram em casa de vegetação sob temperatura controlada, máxima de 30 °C (dia) e mínima de 25 °C (noite). As irrigações foram realizadas em dias intercalados, a fim de evitar o excesso de umidade e a lixiviação dos extratos. O percentual total de emergência foi calculado ao final de 15 dias de decorrência do teste (Brasil 2009). Juntamente a avaliação da emergência foi determinado o índice de velocidade de emergência, quantificado diariamente (15 dias) o número de plântulas emergidas.

Comprimento de radícula e parte aérea: coletou-se 10 plântulas de cada repetição após 15 dias da instalação do bioensaio. As plântulas foram lavadas e secas em papel toalha. As medidas foram obtidas com utilização de régua milimetrada, e os resultados expressos em centímetros (cm). Massa seca total de plântulas: a partir da massa seca de 10 plântulas determinou-se a massa seca total utilizando a mesma metodologia do bioensaio de germinação.

Para identificação e quantificação dos compostos secundários uma amostra de 100 ml (10% p/v) do extrato foi congelada e liofilizada (72 h) em liofilizador modelo Christ, Alpha 2-4 LD plus. Após, 7 g da amostra foi solubilizada em 7 ml de metanol (MeOH) 22,5%. Após dois ciclos de 5 min de sonicação, o extrato foi agitado por 25 s e filtrado em membrana PVDF com poros de 0,45 µm e 0,20 µm. Uma alíquota de 2 ml do extrato filtrado foi transferida para vials de cromatografia, em duas repetições. Os extratos metanólicos das amostras foram analisados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna C18 de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 µm).

Alíquotas de 20 µl foram injetadas automaticamente no equipamento Prominence da Shimadzu, com controlador CBM-20A; detector SPD-20A; desgaseificador DGU 20A5; bomba LC-20AT; amostrador automático SIL-20A e forno CTO 20ª. A fase móvel foi composta de dois solventes: (A)-2% de ácido acético (HOAc) e (B): uma mistura de metanol (MeOH), ácido acético e água MilliQ® (H_2O) (MeOH:HOAc:H_2O; 18:1:1). A vazão do solvente foi de 1 ml/min e o registro na região do ultravioleta (UV) no comprimento de onda 260 nm. As concentrações dos compostos da amostra foram identificadas por meio da comparação de espectro e tempo de retenção dos padrões de compostos conhecidos.

Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x5x4 (métodos de extração x concentrações dos extratos em quatro repetições) e realizadas análises de variância. Foram observados os quadrados médios do resíduo e verificados os pressupostos para anova, a normalidade da distribuição de resíduos (Shapiro e Wilk 1965), a aditividade do modelo estatístico (Tukey 1949) e a homogeneidade de variâncias dos tratamentos por meio do teste de Bartllet (Banzatto e Kronka 2006).

Embora os dados de concentração dos extratos forem quantitativos, foram analisados por meio do teste de comparações de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), devido à falta de ajustamento de um modelo estatístico e baixa explicação do modelo para os valores observados representado através do índice de determinação (R^2). Todas as análises foram realizadas em scripts geradas no software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de germinação foi afetado negativamente pelas concentrações de 50, 75 e 100% em ambos os métodos testados (Tabela 1). Os tratamentos com maior concentração dos extratos (75 e 100%) inibiram a germinação e aumentaram a formação de plântulas anormais. Esse fato ocorre, pois segundo Harper e Balke (1981), o grau de inibição proporcionado por um aleloquímico é dependente da sua concentração.

A redução da germinação também foi verificada por Teixeira et al. (2004) ao avaliarem o potencial alelopático do aquoso da parte aérea de *C. spectabilis* L. na concentração de 12%, relataram a redução de 17,4% do percentual de germinação de sementes de alface com a aplicação de extrato.

O índice de velocidade de germinação (IVG) sofreu atraso significativo nas concentrações de 50% dos extratos (Tabela 1). Os resultados obtidos foram semelhantes aos da germinação, o que indica que a aplicação de maiores concentrações dos extratos provoca a diminuição do vigor das sementes, pois segundo Ferreira e Borghetti (2004), quanto maior o IVG maior o vigor.

As alterações no processo de germinação estão interligadas ao fluxo de água para o interior das células, que podem carregar consigo algumas substâncias alelopáticas, e impedir ou retardar a divisão ou crescimento das células, resultando em um atraso na germinação (Gonzalez et al. 2002). Povh et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes com extratos aquosos de folhas de *Machaerium acutifolium* Vog. (Fabaceae) sobre alface, e observaram a redução da porcentagem e velocidade de germinação com o aumento da concentração e inibição sob concentrações de 100%.

No decorrer das avaliações, observaram-se plântulas com características de anormalidade, principalmente do sistema radicular. As raízes primárias apresentaram atrofiadas e defeituosas, oxidadas e escurecidas, e em alguns casos, praticamente ausentes. Características de anormalidade foram observadas por Carvalho et al. (2014) ao avaliarem o efeito alelopático de diferentes concentrações dos extratos aquosos de crotalária, feijão-de-porco, guandu anão, aveia preta, sorgo e milheto na germinação e crescimento inicial de sementes de alface.

O comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas de manjericão foi influenciado pelas diferentes concentrações e métodos de preparo dos extratos (Tabela 1). Comparados ao controle, o método de extração por maceração apresentou aumento do comprimento do hipocótilo de 0,4 cm nas concentrações de 25 e 50%, com médias acima das detectadas para o método de infusão, que apresentou aumento de 0,2 cm na concentração de 25%. Em ambos os métodos não houve plântulas normais para avaliação do CPA nas maiores concentrações (75 e 100%).

Segundo Gatti et al. (2004), os efeitos dos compostos alelopáticos se relacionam aos processos fisiológicos da planta receptora, e de maneira geral, agem como inibidores da germinação e do crescimento, entretanto a maior parte que são inibitórios em alguma concentração, podem também ser estimulantes quando presentes em menores concentrações. Ou seja, a ação das substâncias aleloquímicas não é muito específica, podendo a mesma substância desempenhar várias funções, dependendo de sua concentração e composição química presente no tipo de extrato utilizado (Cattelan et al. 2007).

Geralmente, os compostos com atividade alelopática atuam como inibidores de crescimento (Einhellig 1999; Ferreira e Áquila 2000), porém, alguns trabalhos demonstram que extratos vegetais podem conter substâncias estimulantes de germinação e de crescimento de plântulas (Rice 1984; Lin et al. 2004). Os estudos de Ghayal et al. (2013) com extratos de folhas de *Cassia uniflora* L. observaram estímulo na germinação e no crescimento inicial de plântulas de mostarda e rabanete nas concentrações de 2,5% e 5% e inibição nas concentrações de 15% e 20%.

Diferente do hipocótilo, o comprimento radicular apresentou redução com a aplicação dos extratos (Tabela 1). Os menores comprimentos de raiz (CR) foram observados na concentração de 25% do extrato por infusão e 50% no método por maceração. Nas concentrações de 75 e 100% não foram detectadas a presença de plântulas normais. Os tratamentos com 25 e 50% de diluição apresentaram maior massa seca total de plântulas (MST) em relação ao tratamento controle.

As substâncias presentes nos extratos promoveram a redução e/ou inibição do crescimento inicial das plântulas e alterações no aspecto morfológico, porém, o crescimento inicial da parte aérea na presença dos extratos apresentou menor sensibilidade quando comparado ao crescimento inicial do sistema radicular. Essa resposta diferente da parte aérea sobre a parte radicular com a aplicação dos extratos é ocasionada pelas estru-

TABELA 1 - Percentual de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR), e massa seca total de plântulas (MST) de manjericão submetidas a dois métodos de extração, infusão (I) e maceração (M), e cinco concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) de extratos de crotalária.

Conc. %	G %		IVG -		CPA --cm--		CR --cm--		MST --g--	
	I	M	I	M	I	M	I	M	I	M
0	93 Aa	93 Aa	9,05 Aa	9,05 Aa	1,80 Ab	1,80 Ab	2,10 Aa	2,10 Aa	0,0149 Ab	0,0149 Ab
25	92 Aa	94 Aa	8,75 Aa	9,34 Aa	2,04 Ba	2,25 Aa	1,07 Bc	1,45 Ab	0,0173 Aa	0,0167 Aa
50	80 Ab	84 Ab	7,84 Ab	8,30 Ab	1,73 Bb	2,20 Aa	1,49 Ab	1,30 Bb	0,0163 Aa	0,0173 Aa
75	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ad	0 Ac	0 Ac	0 Ac
100	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ad	0 Ac	0 Ac	0 Ac
CV (%)	7,92		7,13		9,50		13,32		5,83	

Valores seguidos por letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha, para cada método de extração, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

turas particulares de cada órgão (De Conti e Franco 2011), sendo que o sistema radicular é o mais sensível à ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende das divisões celulares que, se inibidas, comprometem o seu desenvolvimento normal (Hoffmann et al. 2007).

Segundo Chon et al. (2000), em geral, as raízes são mais sensíveis às substâncias presentes nos extratos. Isso se deve ao fato de estarem em contato direto e prolongado com o extrato, em relação às demais estruturas, e neste estádio de desenvolvimento, os efeitos deletérios sobre o metabolismo são mais drásticos, uma vez que ele é o alvo primário dos metabólitos secundários, aliado ao alto metabolismo radicular e sensibilidade ao estresse ambiental (Cruz-Ortega et al. 1998; Chung et al. 2001).

O método de preparo por infusão reduziu o percentual médio de plântulas emergidas nas concentrações de 75 e 100%, com redução de 16 e 18%, respectivamente (Tabela 2). Em ambos os métodos a redução do percentual de emergência foi maior nas concentrações de 75 e 100%. A velocidade de emergência foi mais lenta na infusão, e o IVE diferenciou-se significativamente do tratamento controle, com redução da velocidade a partir da concentração de 50%, mais expressivamente em 75 e 100%. Na maceração o atraso na emergência ocorreu nos tratamentos mais concentrados do extrato (75 e 100%).

As concentrações dos extratos reduziram o comprimento de parte aérea (CPA) das plântulas de manjericão (Tabela 2). Entretanto, não houve diferença entre os métodos de preparo estudados. A ação dos efeitos inibitórios ocorreu com a aplicação dos extratos utilizados em maiores concentrações, com redução de 1,59 e 3,15 cm para os tratamentos 75 e 100%, respectivamente, comparados ao controle.

Não foi verificado aumento do hipocótilo como no teste de germinação em laboratório, no entanto, os tratamentos com as concentrações de 25 e 50% apresentaram médias semelhantes e não diferenciaram significativamente do tratamento controle.

O aumento das concentrações reduziu o comprimento radicular (CR) na emergência de manjericão (Tabela 2). Observa-se que os comprimentos das raízes das plântulas apresentaram redução em todos os tratamentos com o aumento das concentrações, e queda acentuada nos tratamentos com 75 e 100% do extrato, em ambos os métodos de extração.

Assim como ocorreu no bioensaio em laboratório, houve maior efeito dos extratos estudados na redução do sistema radicular do que da parte aérea das plântulas de manjericão, fato também verificado visualmente. De acordo com Carvalho et al. (2014), isso provavelmente se deve à utilização pelas plântulas da reserva nutricional das sementes, havendo a translocação desses componentes nutritivos para o hipocótilo.

A massa seca total (MST) das plântulas foi afetada pela aplicação do extrato (Tabela 2). Entre os métodos, a infusão diferenciou-se com redução do peso na maior concentração (100%), em relação à maceração, em que a redução foi significativa na concentração de 75%. Entre as concentrações testadas, observou-se que as diferenças se tornaram mais acentuadas com o aumento da concentração,

TABELA 2 - Percentual de emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR), e massa seca total de plântulas (MST) de manjericão submetidas a dois métodos de extração, infusão (I) e maceração (M), e cinco concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) de extratos de crotalária.

Conc. %	E %		IVE -		CPA --cm--		CR --cm--		MST --g--	
	I	M	I	M	I	M	I	M	I	M
0	95 Aa	95 Aa	2,92 Aa	2,92 Aa	8,39 Aa	8,39 Aa	6,49 Aa	6,49 Aa	0,2814 Aa	0,2814 Aa
25	91 Aa	95 Aa	2,79 Aa	2,90 Aa	8,19 Aa	7,59 Aa	6,16 Ab	5,83 Ab	0,2518 Ab	0,2523 Aa
50	90 Aa	91 Aa	2,41 Bb	2,79 Aa	8,00 Aa	7,63 Aa	5,58 Ab	5,37 Ab	0,2494 Ab	0,2427 Ab
75	79 Bb	90 Ab	1,62 Bc	2,02 Ab	7,12 Ab	6,48 Ab	4,79 Ac	4,74 Ac	0,2155 Ac	0,1855 Bc
100	77 Bb	83 Ab	1,65 Ac	1,63 Ac	5,16 Ac	5,33 Ac	4,50 Ac	4,56 Ac	0,1064 Bd	0,1456 Ad
CV (%)	4,15		5,68		8,08		10,16		6,50	

Valores seguidos por letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha, para cada método de extração, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

com queda do peso de MST nos tratamentos 75 e 100%, em ambos os métodos.

A aplicação dos extratos nas sementes de manjericão apresentou comportamento distinto com efeitos prejudiciais acentuados nos bioensaios laboratoriais. Isso ocorre, pois, segundo Ferreira e Áquila (2000), os efeitos dos aleloquímicos sobre o crescimento da plântula, são, em geral, muito mais drásticos através do contato direto das sementes com o substrato papel de filtro em relação ao solo. Para o autor, o contato facilita a absorção e a atividade dos compostos devido ao alto metabolismo e estresse em que a plântula se encontra durante sua fase inicial de desenvolvimento, afetando diretamente a divisão celular.

De acordo com Pires e Oliveira (2001), ao serem liberados no solo, ocorre transformação dos aleloquímicos por ação microbiana, podendo tornar esses compostos inertes ou mais eficazes como fitotoxinas. Além da ação dos microrganismos, os aleloquímicos sofrem influência da temperatura, da textura e composição do solo. Segundo Swain (1977), o estudo da alelopatia em ambientes naturais encontra dificuldades para explicação dos resultados, pois, para que o efeito alelopático ocorra as substâncias têm de estar acumuladas no solo numa quantidade suficiente e ter estabilidade por tempo necessário para exercer sua ação.

Além da interferência do meio ambiente, a resposta ao aleloquímico é dependente também da espécie testada. Em experimentos *in vitro* é visível que os extratos promovam redução e/ou inibição no crescimento de outra planta, mas demonstrar que esses compostos estejam presentes no solo em quantidades suficientes para inibir o crescimento de outras plantas envolve tanto efeitos intrínsecos como extrínsecos da planta-alvo (Silva et al. 2006; Barbosa et al. 2008; Pereira et al. 2008).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de *C. juncea* (Figuras 1 e 2)

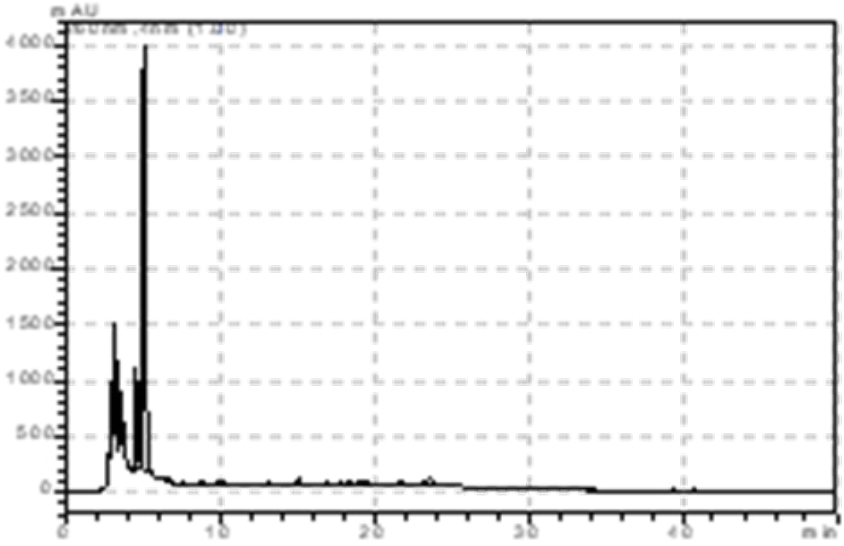

FIGURA 1 - Perfil cromatográfico representativo do extrato aquoso de *Crotalaria juncea* em CLAE.

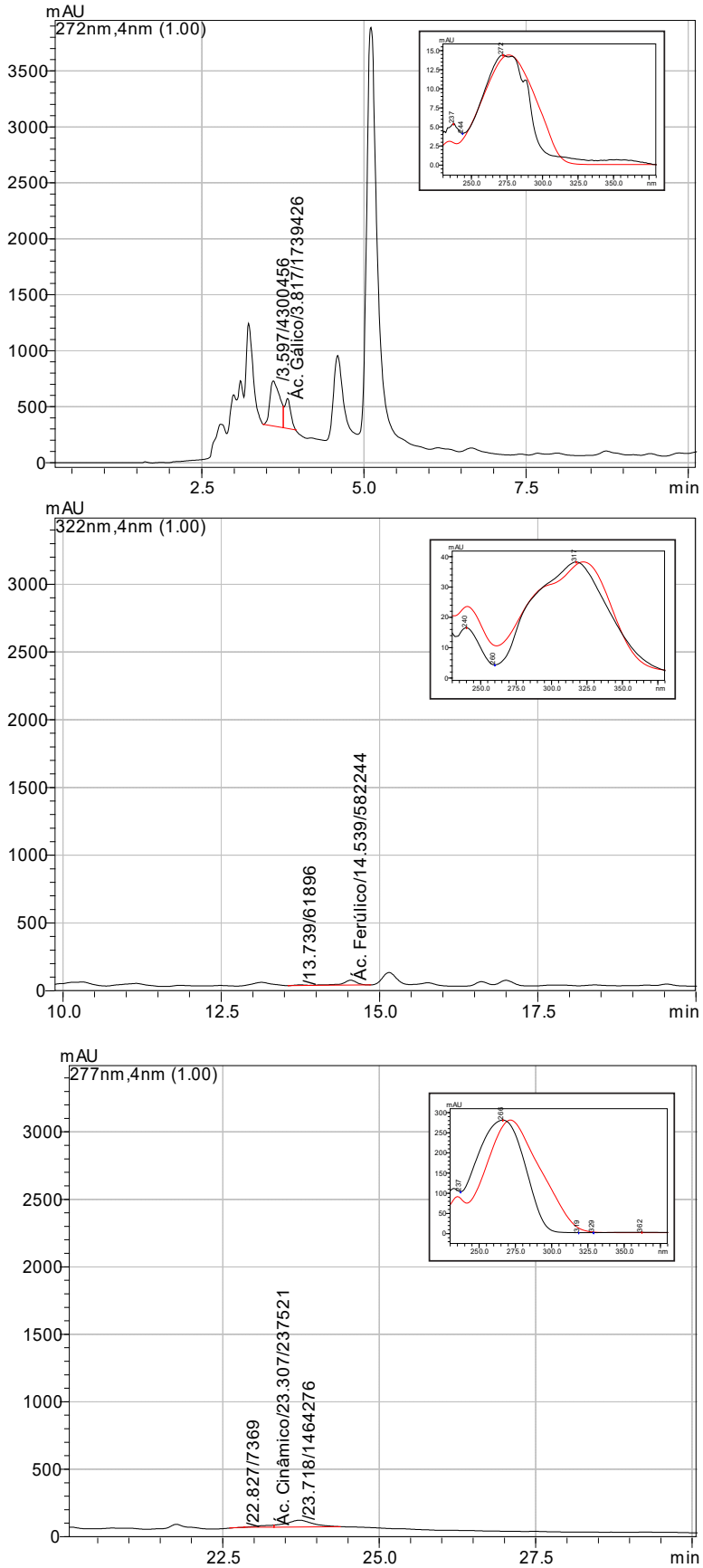

FIGURA 2 - Perfil cromatográfico representativo do extrato aquoso de *Crotalaria juncea* em CLAE com tempo de retenção para o ácido gálico, ácido ferúlico e ácido cinâmico e seus padrões.

identificou a presença de três compostos fenólicos distintos: ácido gálico (t_R= 3,81 min), ácido ferúlico (t_R= 14,53 min) e ácido cinâmico (t_R= 23,30 min). Em relação à quantificação, o ácido gálico foi o composto majoritário (20,63 µg/g), seguido pelo ácido ferúlico (10,74 µg/g) e ácido cinâmico (1,36 µg/g). Na figura 2 estão os perfis cromatográficos com os tempos de retenção (t^R) de cada composto e a comparação com os devidos padrões de identificação.

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza e fazem parte dos constituintes dos vegetais. Normalmente são responsáveis pelas reações de defesa das plantas contra agressões e podem atuar como inibidores em processos de desenvolvimento. Em nível celular, influenciam o metabolismo de lipídios e o mecanismo bioquímico da respiração, inibindo o transporte de glicose e a síntese de celulose (Harborne 1993). Além disso, compreendem o maior grupo de metabólicos que foram identificados como alelopáticos (Carmo et al. 2007). Segundo Taiz e Zeiger (2013), os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, sendo que a maioria é solúvel em água e ocorrem na forma de glicosídeos. Eles são originados pela via do ácido chiquímico e acumulam-se nos vacúolos das células vegetais.

As interações de plantas com seu ambiente são em grande parte influenciadas pelos compostos fenólicos, os quais são os principais compostos alelopáticos que inibem a germinação de sementes, o crescimento de plantas e outros processos fisiológicos (Harborne 1993). Ácidos fenólicos, tais como ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido *p*-anísico foram encontrados por Mendonça (2008) em sementes de feijão-de-porco, causando efeito fitotóxico no desenvolvimento de plântulas de trapoeraba e corda-de-viola.

Para Oliveira et al. (2012), o ácido gálico presente em extratos de folhas e cascas de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) é considerado possível componente alelopático sobre o desenvolvimento de plântulas de alface, onde a partir desse composto foi evidenciando o aparecimento de plântulas anormais e redução do comprimento da parte aérea e da raiz. Souza Filho et al. (2006) mostraram que o efeito do potencial alelopático do ácido gálico sobre a germinação de sementes da planta daninha *Mimosa pudica* L., tem efeito significante na germinação, com 71% de inibição. Segundo Moraes et al. (2006), o ácido gálico é descrito como um importante redutor da germinação de várias plantas. Inderjit et al. (2000) observaram que a atividade alelopática de compostos fenólicos presentes em extratos de *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth e Hook, dependente da concentração, pode promover ou inibir a germinação e o desenvolvimento de plântulas de rabanete.

Os efeitos observados sob as variáveis analisadas para germinação e crescimento inicial de plântulas submetidas à aplicação do extrato, assim como, a identificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida, indicam o efeito alelopático dos extratos de crotalária sobre sementes de manjericão.

Como observado nos resultados, assim como em outras pesquisas, os vários processos utilizados para demonstrar que determinados extratos têm efeitos alelopáticos não provam mais do que a existência de aleloquímicos no material vegetal, não sendo possível inferir em que condições de campo esta se manifesta. Os resultados aqui obtidos são indicativos de potencial alelopático da crotalária, entretanto, novos ensaios deverão ser conduzidos em campo com a implantação da cultura do manjericão sobre a palhada de crotalária cultivada na mesma área. Além de avaliar a persistência do material vegetal e sua interação química com o ambiente, novos testes em laboratório devem ser realizados, com o intuito de identificar outros constituintes químicos responsáveis pelos resultados descritos.

CONCLUSÕES

Os extratos aquosos de crotalária apresentaram potencial alelopático nas concentrações de 75 e 100%, agindo na inibição da germinação de sementes e no crescimento inicial de plântulas de manjericão (*O. basilicum*). Os compostos fenólicos identificados nos extratos foram o ácido gálico (20,63 µg/g), ácido ferúlico (10,74 µg/g) e ácido cinâmico (1,36 µg/g).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Banzatto DA, Kronka SN (2006) Experimentação agrícola. 4. Ed. – Jaboticabal: Funep, 237p.

Barbosa EG, Pivello VR, Meirelles ST (2008) Allelophathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian cerrados. Braz Arch Biol Technol 51(4):825-831. https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000400021

Borella J, Pastorini LH (2009) Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. Rev Biotemas 22(3):67-75. https://doi.org/10.5007/2175-7925.2009v22n3p67

Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J Agric Food Chem 54(5):1822-1828. https://doi.org/10.1021/jf051922u

Brasil (2009) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes Brasília 399p.

Carmo FMS, Borges EEL, Takaki M (2007) Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer aqueous extracts. Acta Bot Bras 21(3):697-705. https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300016

Carovic-stanko K, Liber Z, Javornik B, Bohanec B, Kolak I, Satanic Z (2010) Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. Plant Syst Evol 285:13-22. https://doi.org/10.1007/s00606-009-0251-z

Carvalho LM, Campos ED (2012) Cultivo consorciado do manjericão em sistema de produção orgânico**.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros 7p.

Carvalho MAC, Athayde MLF, Sorato RP, Alves MC (2004) Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional. Pesq Agropec Bras 39(1):47-53. https://doi.org/10.1590/S0100--204X2004000100007

Carvalho WP, De Carvalho GJ, Neto DDOA, Teixeira LGV (2014) Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. Biosci J 30(1):1-11.

Cattelan LV, Stein VC, Heiden G, Buttow MV, Bobrowski VL (2007) Atividade alelopática de extratos aquosos de diferentes espécies de *Plantago* L. Rev Bras Biosci 5(2):210-212.

Chin SU, Coutts JH, Nelson CJ (2000) Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. Agron J 92:715-720. https://doi.org/10.2134/agronj2000.924715x

Chung IM, Ahn JK, Yun SJ (2001) Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus*-gall) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. J Crop Prot 20(10):921-928.

Cruz-ortega R, Anaya AL, Hernández BE, Laguna-Hernández G (1998) Effects of allelochemical stress produced by *Sicyios deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. J Chem Ecol 24(12):2039-2057.

De Conti D, Franco ETH (2011) Efeito alelopático de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* Sw. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. R Bras Agrocien 17(2-4):193-203.

Einhellig FA (1999) An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderjit KMM, Dakshini CL Plant Ecol 479-494.

Erasmo EAL, Azevedo WR, Sarmento RA, Cunha AM, Garcia SLR (2004) Potencial de espécies utilizadas como adubo verde no manejo integrado de plantas daninhas. Planta Daninha 22(3):337-342. https://doi.org/10.1590/S0100-83582004000300002

Falkenberg MB, SSantos RI, Simões CMO (2003) Introdução à análise fitoquímica. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR Famacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC229-245.

Favorito PA, Echer MM, Offemann LC, Schlindwein MD, Colombare LF, Schineider RP, Hachmann TL (2011) Características produtivas do manjericão (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. Rev Bras Plantas Med 13:582-586. https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500013

Ferreira AG, Aquila MEA (2000) Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Braz J Plant Physiol 175-204.

Ferreira AG, BorghettiF (2004) Germinação do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre 323p.

Ferreira NR, Medeiros RB, Soares GLG (2008) Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostisplana ness*) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. Rev Bras Sementes 30(2):43-59. https://doi.org/10.1590/S0101-31222008000200006

Garrido MS, Soares ACF, Coimbra JL, Sousa CS (2008) Manejo da crotalária e do guandu no controle de namatoses do inhame. Summa Phytopathol 34(3):222-227. https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000300003

Gatti AB, Perez SCJGA, Lima MIS (2004) Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta Bot Bras 18(3):459-472. https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000300006 https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000300006

Ghayal N, Dhumal K, Deshpande N, Ruikar A, Phalgune U (2013) Phytotoxic effects of leaf leachates of an invasive weed Synedrella nodiflora and characterization of its allelochemical. Int J Pharm Sci Rev Res 19(1):79-86.

Gomes FM, Fortes AMT, Silva J, Bonamigo T, Pinto TT (2013) Efeito alelopático da fitomassa de *Lupinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). Rev Bras Agroecol 8:48-56.

Gonzalez HR, Mederos DM, Sosa IH (2002) Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratório. Rev Cuba Plantas Med 7(2):67-72.

Harborne JB (1993) Introduction to ecological biochemistry. 4. Ed. London: Academic Press 318p.

Harper JR, Balke NE (1981) Characterization of the inhibition of K^+ absorption in oat roots by salicylic acid. Plant Physiol 68(6):1349-1353. https://doi.org/10.1104/pp.68.6.1349

Hoffmann CEF, Neves LAS, Bastos CF, Wallau GL (2007) Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Rev Ciênc Agrovet 6(1):11-21.

Inderjit CA, Dakshini KMM (2000) Allelopathic potential of *Verbesina encelioides* root leachate in soil. Can J Plant Sci 77(10):1419-1424. https://doi.org/10.1139/b99-097

Lin DZ, Dong YJ, Tsuzuki E, SugimotoY, DongYJ, Matsuo TH (2004) Allelopathic effects of aqueous *Aloe vera* leaf extracts on selected crops. Allelopathy J 13(1):67-74.

Maguire JD (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Sci 2:176-177. https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x

Marshall AJ, Gallaher RN,Wang KH,Mcsorley R (2002) Partitioning of dry matter and minerals in sunn hemp. In: Santen E. van (Ed.). Making conservation tillage conventional: Building a future on 25 years of research. Alabama: Alabama Agric Expt Stn 1:310-313.

Martins AGLA, Nascimento AR, Filho JEM, Filho NEM, Souza AG, Aragão NE, Silva DSV (2010) Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. Cienc Rural 40(8):1791-1796. https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000127

Mendonça RL (2008) Determinação de aleloquímicos por HPLC/ UV-Vis em extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* e estudo da atividade alelopática 116p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Carlos.

Moraes SRG, CamposVP, Pozza EA, Fontanetti A, Carvalho GJ, Maximiniano C (2006) Influência de leguminosas no controle de fitonematoides em cultivo orgânico de alface americana e repolho. Fitopatol Bras 31(2):188-191. https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000200011

Oliveira AK, Coelho MFB, Maia SM, Diógenes FEP (2012) Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferreana* germinação de alface. Cienc Rural 42(8):1397-1403. https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800011

Pereira BF, Sbrissia AF,Serrat BM (2008) 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. Cienc Rural 38(2):561-564. https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000200046

Pires NM, Oliveira VR (2001) Alelopatia. In: Oliveira RS e Constantin J. Plantas daninhas e seu manejo. Guaíba: Agrop 145-185.

PovhJA, Pinto DD, Correa MOG, Ono EO (2007) Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog na germinação de *Lactuca sativa* L. R Bras Biocien 5(2):447-449.

Rice EL (1984) Allelopathy. 2.Ed. New York: Academic422p.

Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete sample). Biometrika 52(3):591-611.

Silva GB, Martim L, Silva CL, Yong MCM, Ladeira AM (2006) Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do cerrado. Hoehnea 33(3):331-338.

Souza Filho APS, Santos RA, Santos LS, Guilhon GMP, Santos AS, Arruda MSP, Mullher AH, Arruda AC (2006) Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. Planta Daninha 24(4):649-656. https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400005

SwainT (1977) Secondary compounds as protective agents. Annu Rev Plant Biol 28:479-501.

Taiz L, Zeiger E (2013) Fisiologia vegetal. 5.Ed. Porto Alegre: ArtMed 954p.

Teixeira CM, Araújo JBS, Carvalho GJ (2004) Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). Ciênc Agrotec 28(3):691-695. https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000300028

Teixeira JPF, Marques MOM, Furlan PR, Facanalli R (2002) Essential oil contents in two cultivars of basil cultivated on NFT-hydroponics. Acta Hortic 569:203-208, 2002.
10.17660/ActaHortic.2002.569.32

Tukey JW (1949) One degree of freedom for non-additivity. Biometrics 5:232-242. http://dx.doi.org/10.2307/3001938