

## Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae)

Cristiane Bezerra Silva<sup>1</sup>, Ana Carina Silva Cândido<sup>2</sup>, Euclésio Simionatto<sup>3</sup>, Odival Faccenda<sup>4</sup>, Silvana de Paula Quintão Scaloni<sup>2</sup> e Marize Teresinha Lopes Pereira Peres<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Hidráulica e Transportes, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cx. Postal, 549, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>4</sup>Departamento de Ciências da Computação, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: marizeperes@hotmail.com

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade alelopática, antioxidante e o teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis*. A bioatividade do extrato bruto e frações (hexânica, acetato de etila e etanol-água) da parte aérea e subterrânea e fração alcaloídica obtidas do extrato bruto (parte subterrânea) de *H. bonariensis*, foram avaliadas em bioensaios de germinação e crescimento de alface, tomate, cebola e trigo, em laboratório. O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi avaliada usando o 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH). Os resultados revelaram que os extratos e frações inibiram a germinação de alface, tomate, cebola, e trigo. A fração acetato de etila da parte subterrânea inibiu a germinação de alface em 68% e de trigo em 60%. Nos bioensaios de crescimento, a fração acetato de etila da parte aérea e subterrânea apresentou os maiores efeitos inibitórios no crescimento da raiz (> 40%), hipocótilo/coleóptilo (> 40%) e massa seca. Sendo a fração acetato de etila da parte subterrânea a que apresentou os maiores teores de fenóis totais, a mais ativa frente ao radical DPPH e também a fração com maior efeito fitotóxico na germinação e crescimento de alface, tomate, cebola e trigo.

**Palavras-chave:** aleloquímicos, herbicidas naturais, *Hydrocotyle bonariensis*.

**ABSTRACT. Allelopathic and antioxidant activity and total phenolic contents of *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae).** The aim of this work was to evaluate the allelopathic and antioxidant activity and the total phenolic contents of *Hydrocotyle bonariensis*. The bioactivity of the crude extract and fractions (hexane, ethyl acetate, ethanol-water) of aerial and underground parts and the alkaloid fraction from underground part of *H. bonariensis* were evaluated by germination and growth bioassays with lettuce, tomato, onion and wheat, in laboratory. The total phenolic contents were determined by the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The results revealed that the extract and fractions inhibited the germination of lettuce, tomato, onion and wheat. The ethyl acetate fraction from the underground part inhibited lettuce germination by 68% and wheat germination by 60%. In the growth bioassays, the ethyl acetate fraction from underground and aerial parts showed strong inhibitory effect in the growth of root (> 40%), hypocotyl/coleoptiles (> 40%) and dry mass. The ethyl acetate fraction from underground parts presented higher total phenolic contents, better activity in the DPPH assay and the fraction with greater phototoxic effect by germination and growth of lettuce, tomato, onion and wheat.

**Key words:** allelochemicals, natural herbicides, *Hydrocotyle bonariensis*.

### Introdução

Araliaceae distribui-se em todo o território brasileiro, com 40 gêneros e 1.500 espécies. O gênero *Hydrocotyle* é representado por 16 espécies, sendo a maioria dos representantes aquáticas ou de lugares úmidos (FIASCHI; PIRANI, 2005). *Hydrocotyle bonariensis* Lam., é conhecida popularmente como erva-de-capitão ou acariçoba. A

planta é nativa nas Américas, ocorrendo dos Estados Unidos até a Argentina e Chile, sendo mencionada como infestante em arroz no Peru. No Brasil, tem vasta distribuição, especialmente na região costeira, sendo uma planta infestante com facilidade de adaptação a climas variados, espalhando-se rapidamente por várias regiões do planeta, podendo ocorrer desde solos secos até na areia das restingas e praias da Costa Atlântica, onde é particularmente

mais frequente (KISSMANN, 1997). Suas raízes são diuréticas, usadas em obstrução hepática, como aperiente, amargas e tônicas e em altas doses são eméticas e as folhas só devem ser usadas externamente para tirar manchas da pele. A planta toda também é utilizada no combate às afecções do baço, fígado, intestino, diarreia, reumatismo e sífilis (LORENZI, 2000).

Os produtos naturais obtidos de matéria-prima vegetal oferecem larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica. Esta atividade pode-se manifestar por meio das suas propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ou farmacológicas (SIMÕES et al., 2000).

As plantas possuem o seu próprio mecanismo de defesa, e as substâncias químicas oriundas do metabolismo secundário, algumas vezes, podem ser considerados “herbicidas naturais”. Os aleloquímicos isolados de plantas ou microrganismos são fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas, mais específicos e menos prejudiciais ao meio ambiente (BHOWMIK; INDERJIT, 2003; DUKE et al., 2002). Dessa forma, a alelopatia pode ajudar, fornecendo novos conceitos de controle integrado de plantas daninhas, variedades de culturas e novas gerações de fitotoxinas (VYVYAN, 2002).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial biológico do extrato e frações da parte aérea e subterrânea de *H. bonariensis* por meio de ensaios de atividade alelopática, antioxidante e quantificar o teor de fenóis totais dos extratos e frações.

## Material e métodos

**Material vegetal** - *Hydrocotyle bonariensis* foi coletada em dezembro de 2006, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Uma exsiccata da espécie foi incorporada aos acervos dos Herbários DDMS da UFGD em Dourados (MS) e no Herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande sob os números: 2190 e 23467, respectivamente. Após a coleta, as partes aéreas e subterrâneas foram separadas e acondicionadas em saco plástico em freezer (-7°C), até sua utilização.

**Obtenção dos extratos etanólicos bruto (EEB) e frações semipurificadas (FS)** - as partes aéreas (folhas e ramos) e subterrâneas (caule subterrâneo e raízes) de *H. bonariensis* foram submetidas à extração por meio de maceração com etanol comercial (m v<sup>-1</sup>, 1:2), à temperatura

ambiente. Após sete dias, foi realizada a filtração, sendo posteriormente o solvente evaporado ( $\pm 40^\circ\text{C}$ ) sob vácuo em evaporador rotativo, obtendo-se o EEB da parte aérea (PA) e subterrânea (PS) de *H. bonariensis*.

Para a obtenção das FS, o EEB da PA e PS foram fracionados pela partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, hexano e acetato de etila, obtendo-se as frações: hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA). Para a obtenção da fração alcaloídica (FA), foi realizada uma extração para alcaloide do EEB da PS. Primeiramente, o EEB foi dissolvido em 20 mL de água destilada e acidificado com HCl 2,0 N até pH 1,5 e, após a acidificação do extrato realizaram-se várias extrações com éter etílico. A solução aquosa remanescente foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) até pH 9,0 e, extraída com éter etílico. Após a eliminação dos solventes em evaporador rotativo, foi obtida a FA. O teor de água dos extratos e das frações foi determinado a partir de uma alíquota dos mesmos, submetidas à secagem (100°C), até que a massa fosse constante.

**Bioensaios da atividade alelopática** - os efeitos potencialmente alelopáticos dos extratos e frações foram avaliados sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Santa Clara), cebola (*Allium cepa* L. cv. Baía Periforme) e trigo (*Triticum aestivum* L. cv. RRS 220), enquanto a FA foi avaliada sobre a germinação e crescimento de alface e de cebola. Para os bioensaios, solução-estoque na concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da massa calculada para cada extrato e frações, levando-se em consideração o teor de umidade, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), sendo as concentrações de 500 e 250 mg L<sup>-1</sup> preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS et al., 2000) com solução de KOH 0,1 N, utilizando-se pHmetro. Como controle procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman n. 1,0, previamente autoclavados, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos (MACIAS et al., 2000), preparadas nas concentrações de 250, 500 e 1.000 mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, semearam-se sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie-alvo (alface, tomate, cebola, trigo), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução (BRASIL, 1992).

As sementes de trigo foram tratadas com fungicida Benlate 500 PM (1,0 g L<sup>-1</sup>) (ARAÚJO; ARAÚJO, 2006). As placas de Petri foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa (±80%) e temperatura constante, adequadas a cada espécie-alvo (BRASIL, 1992) (alface, 25°C com luz interna constante; tomate, 25°C e fotoperíodo de 12h; cebola, 15°C e fotoperíodo de 12h; e trigo 15°C, no escuro; ±2°C). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente (para alface a cada 12h) conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), contabilizando-se como plântulas normais todas que possuíam as estruturas essenciais do embrião desenvolvidas e com no mínimo 2,0 mm de comprimento de radícula. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento, primeiramente as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri, contendo papel filtro umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo as soluções-tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação (MACIAS et al., 2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (10 plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente, essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca.

Para cada extrato e frações avaliados o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, envolvendo nove ensaios simples com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1.000 mg L<sup>-1</sup>), em quatro repetições. A unidade experimental constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando se detectou diferença pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade. Quando uma das pressuposições exigidas pelo modelo paramétrico não foi atendida, utilizaram-se os testes estatísticos não-paramétricos, Kruskal-Wallis como alternativa para a análise de variância e Mann-Whitney como alternativa para o teste de Dunnet.

**Testes químicos** - análises químicas preliminares foram realizadas para a detecção de classes de compostos presentes nos extratos e frações. Foram utilizadas placas cromatográficas (cromatofolhas AL TLC 20 x 20 cm, silicagel 60F<sub>254</sub> - Merk), para detectar a presença das principais

classes de compostos secundários no EEB e nas FS. Nestes testes foram utilizados como reagente indicador, uma solução de cloreto férrico 1,0%, reativa na presença de compostos fenólicos.

**Determinação do teor de fenóis totais** - a determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (LIN; TANG, 2007; MEDA et al., 2005). Os extratos e frações (5 mg) foram dissolvidos em 5 mL de metanol. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi transferida para balões de 5 mL. A esta solução adicionou-se 1 mL de água destilada e, posteriormente, 0,2 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Finalizando, adicionou-se 0,6 mL de uma solução 20% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e completou-se o volume com metanol. Após 90 min., a absorbância das amostras foi medida a 760 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (25 a 600 µg mL<sup>-1</sup>) e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**Análise da atividade antioxidante** - para a detecção da atividade antioxidante, 50 µL de soluções com várias concentrações dos extratos e frações em metanol (1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a 5 mL de uma solução metanólica de DPPH a 0,004%. Após um período de incubação de 30 min., à temperatura ambiente, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro frente a um branco a 517 nm (KATALINIC et al., 2004). A inibição do radical livre DPPH (em %) foi calculada pela expressão  $I \% = (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}/A_{\text{branco}}) \times 100$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## Resultado e discussão

A análise dos efeitos alelopáticos dos extratos e frações da parte aérea (PA) e subterrânea (PS) de *H. bonariensis* indicou que a intensidade dos efeitos variou em função do extrato e frações avaliados e da concentração utilizada como indicadora. Nos resultados de germinação (Tabelas 1 e 2) verificou-se que o extrato etanólico bruto (EEB) e todas as frações da PA e PS de *H. bonariensis* reduziram significativamente o índice de velocidade de germinação (IVG) e a porcentagem de germinação (%G) de alface, tomate, cebola e trigo, em todas as concentrações ensaiadas. Observa-se nesses resultados que o aumento das concentrações dos extratos e frações provocou maior redução nas características avaliadas.

**Tabela 1.** Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface, tomate, cebola e trigo submetidos a diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) da parte aérea de *Hydrocotyle bonariensis*.

	IVG				%G			
	Controle	250	500	1.000	Controle	250	500	1.000
	mg L <sup>-1</sup>							
Alface								
EEB <sup>2</sup>	25,0 a	18,7 b	16,6 b	14,6 b	99,5 a	81,0 b	70,5 b	65,5 b
FH <sup>1</sup>	25,0 a	14,6 b	12,8 b	10,3 b	99,5 a	64,5 b	59,5 b	47,0 b
FAE <sup>1</sup>	25,0 a	6,2 b	4,9 b	3,9 b	99,5 a	53,0 b	41,0 b	31,5 b
FEA <sup>2</sup>	25,0 a	12,5 b	6,7 b	5,4 b	99,5 a	81,0 b	49,0 b	37,0 b
Tomate								
EBB <sup>1</sup>	13,5 a	6,6 b	5,3 b	5,2 b	93,0 a	73,0 b	67,0 b	56,5 b
FH <sup>1</sup>	13,5 a	7,3 b	6,5 b	5,5 b	93,0 a	81,0 b	70,0 b	62,0 b
FAE <sup>2</sup>	13,5 a	7,8 b	6,6 b	5,1 b	93,0 a	83,5 b	66,5 b	54,0 b
FEA <sup>1</sup>	13,5 a	8,2 b	6,7 b	6,4 b	93,0 a	87,5 b	71,0 b	65,0 b
Cebola								
EBB <sup>2</sup>	11,3 a	6,0 b	4,9 b	4,1 b	97,5 a	78,5 b	65,0 b	58,0 b
FH <sup>2</sup>	11,3 a	6,8 b	5,9 b	4,9 b	97,5 a	91,5 b	81,0 b	75,0 b
FAE <sup>2</sup>	11,3 a	5,5 b	4,5 b	3,8 b	97,5 a	73,5 b	67,0 b	57,0 b
FEA <sup>2</sup>	11,3 a	6,0 b	4,9 b	4,1 b	97,5 a	83,0 b	76,5 b	70,5 b
Trigo								
EBB <sup>2</sup>	23,4 a	20,5 b	15,4 b	14,1 b	99,5 a	85,5 b	69,0 b	73,0 b
FH <sup>1</sup>	23,4 a	15,2 b	11,4 b	11,2 b	99,5 a	82,0 b	70,5 b	61,0 b
FAE <sup>1</sup>	23,4 a	8,9 b	7,2 b	5,7 b	99,5 a	65,0 b	55,0 b	47,0 b
FEA <sup>1</sup>	23,4 a	14,6 b	12,4 b	8,7 b	99,5 a	73,0 b	67,0 b	61,0 b

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra do controle não difere entre si pelo teste de Dunnett e <sup>2</sup>Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface, tomate, cebola e trigo submetidos a diferentes concentrações extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração etanol-água (FEA) e fração alcoólica (FA) da parte subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis*.

	IVG				%G			
	Controle	250	500	1.000	Controle	250	500	1.000
	mg L <sup>-1</sup>							
Alface								
EEB <sup>2</sup>	24,7 a	15,7 b	13,6 b	12,6 b	100,0 a	67,0 b	61,0 b	57,0 b
FH <sup>2</sup>	24,7 a	9,3 b	6,2 b	4,5 b	100,0 a	85,0 b	75,0 b	70,0 b
FAE <sup>1</sup>	24,7 a	5,0 b	2,8 b	2,7 b	100,0 a	61,0 b	51,0 b	47,0 b
FEA <sup>2</sup>	24,7 a	7,8 b	5,5 b	4,4 b	100,0 a	65,0 b	55,0 b	53,0 b
FA <sup>1</sup>	24,8 a	18,1 b	17,6 b	10,9 b	99,0 a	91,0 b	87,0 b	77,0 b
Tomate								
EBB <sup>1</sup>	14,7 a	5,7 b	4,2 b	3,1 b	95,0 a	71,0 b	62,0 b	51,0 b
FH <sup>1</sup>	14,7 a	8,3 b	7,5 b	6,4 b	95,0 a	79,0 b	71,0 b	63,0 b
FAE <sup>2</sup>	14,7 a	5,1 b	3,8 b	2,4 b	95,0 a	63,0 b	53,0 b	49,0 b
FEA <sup>1</sup>	14,7 a	7,1 b	5,6 b	4,4 b	95,0 a	71,0 b	67,0 b	63,0 b
Cebola								
EBB <sup>2</sup>	10,6 a	5,6 b	4,8 b	3,7 b	98,0 a	77,0 b	63,0 b	57,0 b
FH <sup>2</sup>	10,6 a	8,3 b	7,5 b	6,8 b	98,0 a	85,0 b	78,0 b	69,0 b
FAE <sup>2</sup>	10,6 a	3,3 b	3,6 b	2,8 b	98,0 a	62,0 b	55,0 b	45,0 b
FEA <sup>2</sup>	9,5 a	9,8 b	7,4 b	7,0 b	98,0 a	75,0 b	67,0 b	60,0 b
FA <sup>1</sup>	10,6 a	5,6 b	4,8 b	3,7 b	95,0 a	88,0 b	77,0 b	73,0 b
Trigo								
EBB <sup>2</sup>	24,3 a	16,5 b	11,2 b	10,4 b	100,0 a	79,0 b	71,0 b	67,0 b
FH <sup>1</sup>	24,3 a	18,3 b	16,5 b	14,5 b	100,0 a	80,0 b	71,0 b	64,0 b
FAE <sup>1</sup>	24,3 a	6,8 b	5,2 b	4,7 b	100,0 a	59,0 b	50,0 b	40,0 b
FEA <sup>1</sup>	24,3 a	12,5 b	10,4 b	9,6 b	100,0 a	72,0 b	61,0 b	55,0 b

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra do controle não difere entre si pelo teste de Dunnett e <sup>2</sup>Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

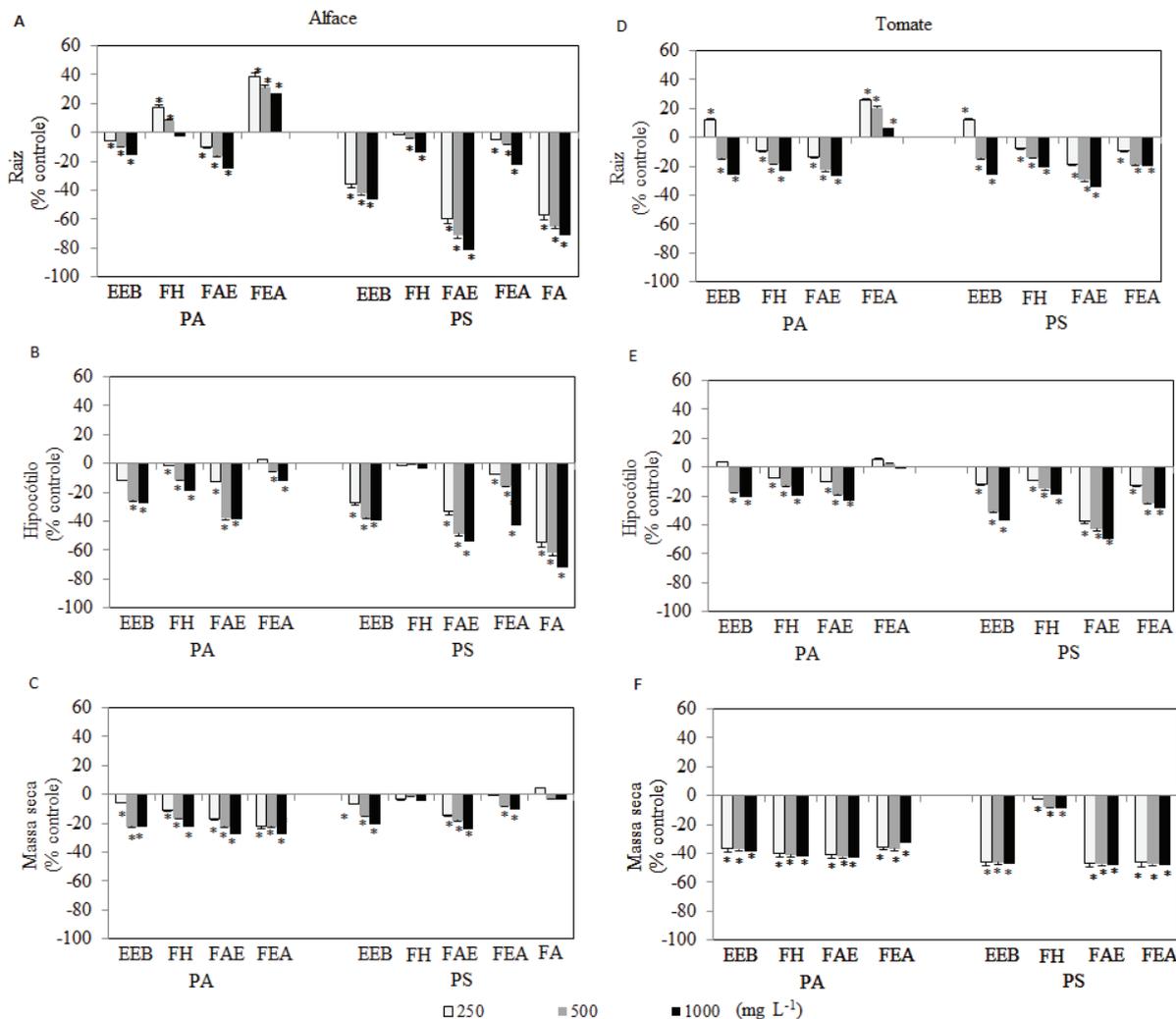
Os maiores efeitos inibitórios foram verificados na fração acetato de etila (FAE) da PA e PS, sendo observado que a concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup> dessas frações atrasaram a germinação de alface, tomate, cebola e trigo em valores superiores a 60% (p < 0,05), em relação ao controle. Na

germinabilidade (%G), também foram observados que os maiores efeitos fitotóxicos foram provocados pela FAE da PA e PS (Tabelas 1 e 2), verificando-se inibições na germinação superiores a 40%, em relação ao controle. A maior concentração avaliada (1.000 mg L<sup>-1</sup>) da FAE da PA (Tabela 1) inibiu a germinação de alface em 68% e de trigo em 52% e a FAE da PS (Tabela 2) inibiu em 53% a germinação de alface e em 60% em trigo. Portanto, as substâncias químicas presentes na FAE tanto da PA como da PS foram as que produziram as maiores inibições sobre a germinação das sementes-alvo.

No crescimento das plântulas de alface e tomate (Figura 1), evidenciaram-se os maiores efeitos inibitórios na FAE tanto da PA como da PS, porém a FAE da PS apresentou maior fitotoxicidade no crescimento das plântulas que a FAE da PA.

No crescimento de alface, verificou-se que a concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup> da FAE e da fração alcoólica (FA) da PS (Figura 1A, B e C) inibiram o crescimento da raiz em 82 e 71%, do hipocótilo em 54 e 72%, respectivamente, e a FAE da PA reduziu o acúmulo de massa seca em 24%, em relação ao controle. Em tomate, a FAE da PS inibiu o crescimento da raiz em 34%, do hipocótilo em 49% e reduziu o acúmulo de massa seca em 48%. Estímulo no crescimento também foi observado pela fração hexânica (FH) e fração etanol-água (FEA) da PA em alface e pela menor concentração do EBB e todas as concentrações da FEA da PA em tomate que estimularam o crescimento da raiz. O conceito de alelopatia, cunhado por Molisch em 1937 (RICE, 1984), envolve tanto os efeitos deletérios como os estimulatórios. Aparentemente, estes últimos estão associados à concentração da substância, manifestando-se em situação de baixa concentração (RICE, 1984). Na maioria das vezes, essas substâncias podem afetar a permeabilidade da membrana e, em altas concentrações, inibir a absorção de água e nutrientes, em baixas concentrações pode facilitar a absorção desses (EINHELLIG, 2002).

Melos et al. (2007) observaram efeitos semelhantes aos verificados na FAE em estudo, para a FAE de *Adiantum tetraphyllum*, que inibiu o crescimento do hipocótilo em alface, na concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup>. Em trabalho realizado por Alves et al. (2003) foi verificado que alcaloides glicosilados provocaram uma redução significativa na porcentagem de plântulas normais a partir da menor concentração testada, e que estes efeitos inibitórios foram revelados pela visível redução do comprimento da raiz que foi proporcional ao aumento da concentração avaliada.



**Figura 1.** Comprimento da raiz, hipocótilo e acúmulo de massa seca de alface e tomate em função das concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) da parte aérea (PA) e subterrânea (PS) e fração alcaloídica (FA) da PS de *Hydrocotyle bonariensis*. Dados expressos em percentual em relação ao controle. \*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnett.

A exemplo dos resultados obtidos acerca do crescimento de alface e tomate, os efeitos sobre o crescimento de cebola e trigo foram semelhantes (Figura 2). Assim, também foi evidenciado que a FAE da PA e PS foram as que provocaram os maiores efeitos inibitórios tanto no crescimento de cebola como em trigo. Sendo a PS a que apresentou os maiores efeitos de fitotoxicidade. Em cebola, verificou-se que a FAE e a FA da PS inibiram o crescimento da raiz em 55 e 57%, do coleóptilo em 68% e reduziram o acúmulo de massa seca em 37 e 29%, respectivamente. As plântulas de trigo foram as mais sensíveis, apresentando inibições no crescimento superiores a 40% tanto para os extratos e frações da PA e da PS. A FAE da PA inibiu o crescimento da raiz em 56%, do coleóptilo em 45% e reduziu a massa seca

em 43% e a FAE da PS inibiu o crescimento da raiz em 72%, o coleóptilo em 46% e a massa seca em 9%. Chavasiri et al. (2005), em trabalhos realizados com *Hydrocotyle umbellata* (Araliaceae), verificaram que a substância Metil-oleanolato-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) isoladas dessa planta, inibiu em 100% a germinação de *Mimosa pigra* L., e provocou inibição de 87% no crescimento da raiz e em 80% para o hipocótilo, na maior concentração ensaiada.

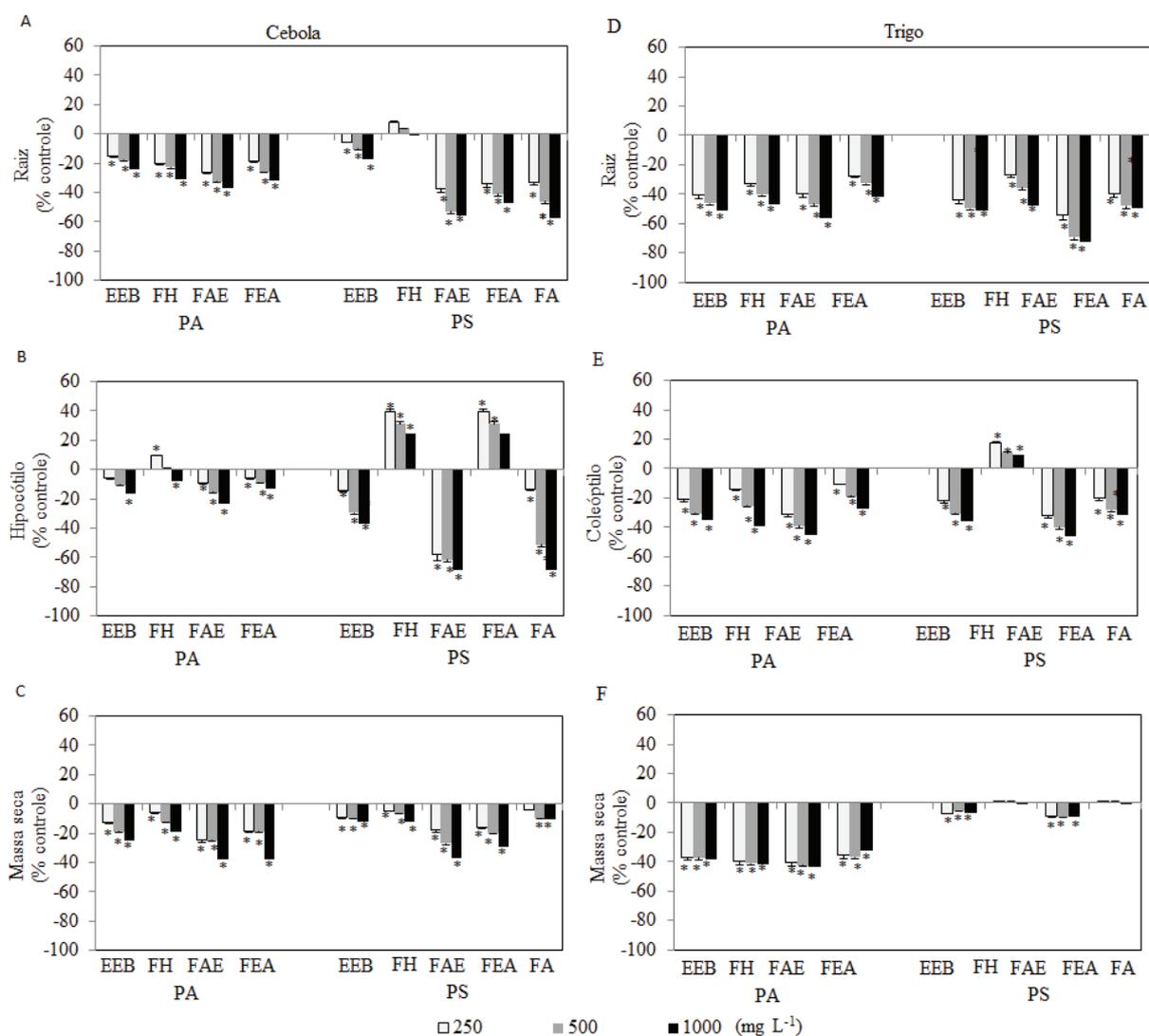
Comparando-se o crescimento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo, observa-se que os efeitos fitotóxicos foram mais evidentes no crescimento da raiz do que na parte aérea (hipocótilo/coleóptilo), isso pode ter ocorrido pela absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares ser favorecida pelo contato

físico da raiz com o papel filtro, o qual contém os extratos e frações. Desta forma, a bioatividade dos extratos está condicionada à capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação das substâncias potencialmente alelopáticas (CORREIA et al., 2005).

As alterações no padrão de germinação e crescimento podem resultar de diversos efeitos causados em nível primário (GUSMAN et al., 2008). Dentre elas, Ferreira e Áquila (2000) destacam alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração, pelo sequestro do oxigênio, na

conformação de enzimas e receptores, ou ainda, pela combinação destes fatores.

Nos testes químicos preliminares foi verificada a presença de compostos fenólicos nos extratos e frações, sendo também detectada a presença de alcaloides na FAE da PS. Vários compostos pertencentes às classes dos alcaloides, terpenos, e compostos fenólicos já foram identificados como aleloquímicos em outras plantas. Esses compostos podem ser responsáveis, de modo isolado ou sinérgico, pela interferência nos processos fisiológicos durante a fase de crescimento das espécies-alvo de dicotiledôneas e monocotiledôneas em estudo (EINHELLIG, 2002).



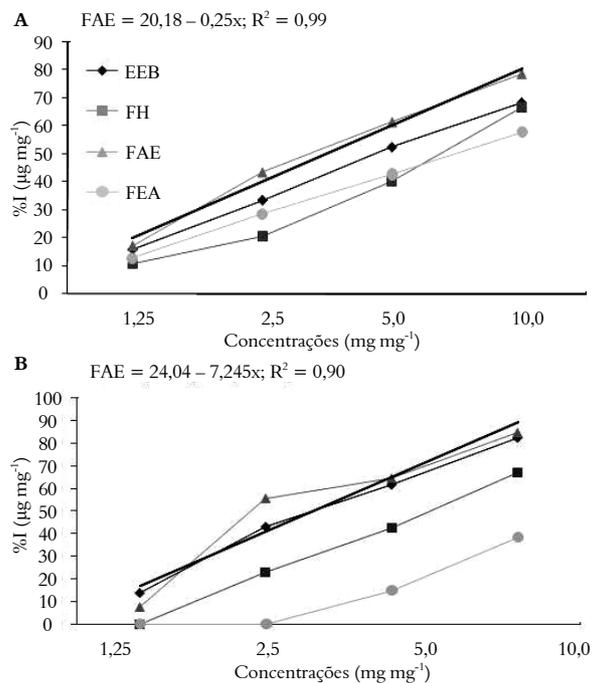
**Figura 2.** Comprimento da raiz, hipocótilo e acúmulo de massa seca de cebola e trigo em função das concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) da parte aérea (PA) e subterrânea (PS) e fração alcaloídica (FA) da PS de *Hydrocotyle bonariensis*. Dados expressos em percentual em relação ao controle. \*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Dunnet.

Os teores de fenóis totais contidos no extrato e frações foram determinados pelo método colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados são expressos como equivalentes ao ácido gálico ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  de extrato). De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, a amostra que apresentou maior teor de fenólicos totais foi a FAE da PA e PS, com os valores de  $307,12 \pm 1,19$   $\mu\text{g mg}^{-1}$  e  $501,92 \pm 1,44$   $\mu\text{g mg}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 3.** Teor total de fenóis presentes no extrato e frações da parte aérea (PA) e subterrânea (PS) de *Hydrocotyle bonariensis* ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  de frações).

	Total de fenóis <sup>1</sup> ( $\mu\text{g EAG mg}^{-1}$ )	
	PA	PS
Extrato bruto	192,72 $\pm$ 0,61	196,72 $\pm$ 0,69
Fração hexânica	24,72 $\pm$ 0,63	86,72 $\pm$ 1,13
Fração acetato de etila	307,12 $\pm$ 1,19	501,92 $\pm$ 1,44
Fração etanol-água	290,32 $\pm$ 1,03	174,72 $\pm$ 1,21

A análise da atividade antioxidante do extrato e frações da PA e PS de *H. bonariensis* foi determinada pelo método que emprega o radical livre DPPH. Como apresentado na Figura 3, observa-se que a maior capacidade de sequestrar radicais livres é atribuída à FAE tanto da PA como da PS, e a FEA foi a menos ativa.



**Figura 3.** Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) da parte aérea (A) e subterrânea (B) de *H. bonariensis*, frente ao DPPH.

Com esses resultados, verifica-se que a FAE do EEB da PS de *H. bonariensis* foi a que apresentou os

maiores teores de fenóis totais e aquela mais ativa frente ao radical DPPH, sendo também a fração que apresentou maior efeito fitotóxico na germinação e crescimento de alface, tomate, cebola e trigo.

Considerando a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais, diversos são os relatos que justificam que a alta atividade biológica esteja relacionada à presença de compostos fenólicos (BASILE et al., 2005). No caso de *H. bonariensis*, esta abordagem pode ser aplicada, pois a fração mais ativa em relação à atividade antioxidante (FAE) foi também a que apresentou maior teor de compostos fenólicos e maior atividade fitotóxica. Classes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes também podem apresentar propriedades alelopáticas. Entre as substâncias fenólicas descritas por suas ações alelopáticas podem-se citar os derivados dos ácidos cinâmico e benzoico, sendo os mais frequentes clorogênico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico e vanílico. Representantes pertencentes a classes como cumarinas, quinonas, flavonoides e taninos também são conhecidos como inibidores da germinação de sementes e do crescimento de plantas (EINHELLIG, 2002; MALHEIROS; PERES, 2001).

A literatura relata o isolamento de alguns compostos em espécies do gênero *Hydrocotyle* distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de várias partes do mundo. Estudos químicos evidenciaram a ocorrência de substâncias de várias classes de compostos, sendo os terpenos, e saponinas os constituintes mais frequentes na maioria das espécies relatadas na literatura (JANARDHANAN; THOPPIL, 2002). Nenhum estudo foi verificado na literatura referente aos constituintes químicos de *H. bonariensis*.

## Conclusão

A investigação do potencial alelopático da parte aérea e subterrânea de *H. bonariensis* em laboratório evidencia que essa espécie apresenta compostos químicos com atividade fitotóxica na germinação e crescimento das espécies-alvo avaliadas.

A fração acetato de etila e a fração alcaloídica da parte subterrânea apresentaram a maior fitotoxicidade na germinação e no crescimento da raiz e hipocótilo/coleótilo nas espécies-alvo avaliadas. A fração acetato de etila da parte subterrânea apresentou maior atividade fitotóxica, antioxidante e maior teor de fenóis totais. Porém, são necessários estudos posteriores para isolamento e identificação do(s) composto(s) químico(s) com

atividade fitotóxica presente nessa fração. Assim, essas informações poderão ser úteis para futuras pesquisas para o desenvolvimento de novos e bioativos compostos químicos de produtos naturais.

### Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alan Sciamarelli, pela identificação botânica. A PROPP/UFMS e Fundect/Capes, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

### Referências

- ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 93-97, 2003.
- ARAÚJO, A. S. F.; ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação de *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 973-976, 2006.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal Ethnopharmacol**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.
- BHOWMIK, P. C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v. 22, n. 8, p. 661-671, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992.
- CHAVASIRI, W.; PRUKCHAREON, W.; SAWADEE, P.; ZUNGSONTIPORN, S. Allelochemicals from *Hydrocotyle umbellata* Linn. In: WORLD CONGRESS ON ALLELOPATHY, 4., 2005, New South Wales. **Annals...** New South Wales: University in Wagga, 2005. p. 15-18.
- CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influência de extratos aquosos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v. 35 n. 3, p. 498-503, 2005.
- DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2079-2093, 2000.
- DUKE, S. O.; RIMANDO, A. M.; BAERSON, S. R.; SCHEFFLER, B. E.; OTA, E. Strategies for the use of natural products for weed management. **Journal of Pesticide Science**, v. 27, n. 3, p. 298-306, 2002.
- EINHELLIG, F. A. The physiology of allelochemical action: Clues and Viewa. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. (Ed.). **Allelopathy from molecules to ecosystems**. Vigo: Universidade de Vigo, 2002. p. 1-23.
- FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, Edição especial, p. 175-204, 2000.
- FIASCHI, P.; PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó. **Boletim Botânico Universitário**, v. 23, n. 2, p. 78-81, 2005.
- GUSMAN, G. S.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 119-125, 2008.
- JANARDHANAN, M.; THOPPIL, E. J. Chemical composition of two species of *Hydrocotyle* (Apiaceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 52, n. 10, p. 67-69, 2002.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIÉ, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 593-600, 2004.
- KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, 1997.
- LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 140-147, 2007.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres e aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Plantarum, 2000.
- MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Ed. Universitária Argos, 2001.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; BEECHER, G. R. Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in *Burkina fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 571-577, 2005.
- MELOS, L. R.; SILVA, L. B.; PERES, M. T. L. P.; MAPELI, A. M.; FACCENDA, O.; ANJOS, H. H.; TORRES, T. G.; TIVIROLI, S. C.; BATISTA, A. L.; ALMEIDA, F. G. N.; FLAUZINO, N. S.; TIBANA, L. A.; HESS, S. C.; HONDA, N. K. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex willd (Pteridaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 292-297, 2007.
- RICE, L. **Allelopathy**. Londres: Academic Press. 1984.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for news herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, n. 9, p. 1631-1646, 2002.

Received on September 19, 2009.

Accepted on January 12, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.