1. INTRODUÇÃO

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), considerado como planta medicinal pertence à família Lamiaceae é também conhecido como alecrim rosmarinho, alecrim de jardim, alecrim da horta ou erva da graça. Originário do sul da Europa e norte da África é cultivado em jardins e hortas e reproduz-se por sementes. Apresenta-se como arbusto aromático, muito ramificado, o fruto é um aquênio. Toda a planta exala um aroma forte e agradável. As folhas e as flores são as partes utilizadas como condimento ou na medicina popular.

É originário da Costa do Mar Mediterrâneo, sendo também conhecido pelo nome de "Rosmarinus" que lembra a denominação latina "ros marinus" - "rosa do mar". Arbusto aromático que floresce quase todo o ano. A sua essência entra em muitos medicamentos, composição de bálsamos para fricções, e de certos produtos de perfumaria - água de Colônia, por exemplo. As folhas do alecrim são recomendadas no estímulo à circulação. Também auxiliam na digestão de gorduras e no combate à dor de cabeça associada com tensão nervosa. As folhas contêm entre 1 e 2,5% de óleo essencial, composto por 15 a 25% de cânfora (http://www.herbario.com.br/dataherb18/alecrim.htm).

Esta espécie pode também apresentar efeitos alelopáticos pois possui diferentes compostos importantes na constituição de seu óleo essencial, principalmente pinenos, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, ácido rosmarínico, cânfora e diterpenos. Possui também ácidos orgânicos, flavonóides, saponinas, traços de alcalóides, princípios amargos e taninos.

Possui propriedades que atuam como antisséptico pulmonar, antidepressivo, calmante, auxiliar em problemas de memória, estafa, cansaço mental, afecções das vias respiratórias (Horta Orgânica, 2003).

O uso das plantas para fins medicinais é provavelmente tão antigo como a humanidade. Embora o homem faça uso há milhares de anos, das plantas

medicinais como fonte primária de medicamentos, e as mais utilizadas tenham suas propriedades terapêuticas demonstradas pela ciência, pouco se sabe de seu potencial tóxico (PINHO *et al.*, 2004).

O efeito de uma planta sobre a outra é conhecido por alelopatia, que é definida como um fenômeno químico-ecológico pelo qual uma espécie vegetal interfere no desenvolvimento de outra, através da ação de produtos de seu metabolismo secundário (PEREIRA *et al.*, 2004).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicum esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática (ALVES *et al.*, 2004_a). Além dessas, o *Allium cepa* L. (cebola) também faz parte dos bioindicadores reconhecidos internacionalmente.

Diante da variedade da atuação dos compostos secundários, principalmente na ação alelopática, Bagchi *et al.* (1997 apud GATTI, PERES & LIMA, 2004) consideram os aleloquímicos como um recurso para o desenvolvimento de herbicidas naturais ou de um estimulante para o crescimento de algumas plantas. A maioria dos trabalhos relata que 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 (GATTI, PERES & LIMA, 2004).

As sementes são excelentes organismos para bioensaios. Enquanto estiverem desidratadas elas permanecem dormentes e podem ser armazenadas por longos períodos sem perder viabilidade. No entanto, assim que são reidratadas, elas entram no processo de germinação, durante o qual, sofrem rápidas mudanças fisiológicas e tornam-se altamente sensíveis ao estresse ambiental. Esses tipos de bioensaios são úteis para verificarmos citotoxicidade e genotoxicidade (BÜTTOW, *et al.*, 2004).

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito alelopático do extrato aquoso de alecrim obtido por diferentes formas utilizando sementes de cebola e alface como organismos testes.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do extrato aquoso de alecrim obtido através dos métodos de infusão, decocção e maceração em sementes de cebola.

Avaliar o efeito do extrato aquoso de alecrim obtido através dos métodos de infusão e decocção em sementes de alface.

Comparar os organismos testes para identificar o mais sensível ao extrato aquoso de alecrim.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo alelopatia foi cunhado por Molisch (1937) e significa do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias gasosas volatilizadas no ar que cercam as plantas terrestres. Rice (1984) definiu alelopatia como: "qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente" (FERREIRA & ÁQUILA, 2000)

De acordo com Waller (1999), a atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas). A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário, porque na evolução das plantas representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Os recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, têm contribuído para um conhecimento mais acurado de inúmeros compostos secundários, que podem ser agrupados de diversas formas. Muitos destes compostos são potencialmente aleloquímicos (Tab. 1). Eles variam na planta em concentração, localização e composição, podendo ser excretados para o meio no solo ou no ar de forma ativa ou simplesmente lixiviados. O tempo de residência, a persistência e a transformação podem aumentar, diminuir ou fazer cessar o seu efeito alelopático, pela ação de

microrganismos no solo. Inclusive, o próprio andamento diário do metabolismo primário, com formação de cadeias carbonadas que variam nas diferentes horas do dia, tem repercussões no metabolismo secundário.

Tabela 1 - Grupo de princípios ativos e suas propriedades medicinais e/ou tóxicas

ALCALÓIDES	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais. Ex.: Cafeína do café e guaraná, teobromina do cacau, pilocarpina do jaborandi, etc.
MUCILAGENS	Cicatrizante, antinflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico. Ex.: babosa e confrei.
FLAVONÓIDES	Antiinflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, anti-dematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, anti-hepatotóxico, colerético e antimicrobiano. Ex.: rutina (em arruda e favela).
TANINOS	Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas. Ex.: barbatimão e goiabeira.
ÓLEOS ESSENCIAIS	Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmódico. Ex.: mentol nas hortelãs, timol no tomilho e alecrim pimenta, ascaridol na erva-de-santa-maria, etc.

Fonte: USP/ESALQ (1999).

O efeito visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores. Assim, os estudos sobre o efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de efeitos ocorridos a nível molecular e celular inicialmente (FRANÇA, 2003). Ainda há relativamente poucas informações sobre estes mecanismos.

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser grosseiramente dividido em ação direta e indireta. Nesta última pode-se incluir alterações nas propriedades do solo, de suas condições nutricionais e das alterações de populações e/ou atividade dos microorganismos. O modo de ação direto ocorre quando o aleloquímico liga-se às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo.

Segundo Ferreira & Áquila (2000) os aleloquímicos podem afetar: 1- estruturas citológicas e ultra-estruturais; 2- hormônios, tanto alterando suas concentrações quanto o balanço entre os diferentes hormônios; 3- membranas e sua permeabilidade; 4- absorção de minerais; 5- movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; 6- respiração; 7- síntese de proteínas; 8- atividade enzimática; 9- relações hídricas e condução; 10- material genético, induzindo alterações no DNA e RNA. As alterações do aleloquímico podem ser pontuais, mas, como o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo "feedback", rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos.

Todas as plantas produzem metabólitos secundários, que variam em qualidade e quantidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas.

Fatores ambientais, tal como a fertilidade do solo, desempenham importante papel na produção e acúmulo de substâncias com atividade medicinal. Alguns autores têm demonstrado que o uso de fertilizantes pode aumentar a produção e o acúmulo de metabólitos em culturas de *Mentha arvensis* L. (Singh *et al.*, 1988), de *Cymbopogon martini* (Roxb.) J. F. Watson (palma-rosa) (Rao *et al.*, 1989) e de *Papaver* sp. (Jain, 1990a, b), entre outros (FRANÇA, 2003).

O efeito destes metabólitos tem sido estudado através de bioensaios *in vitro* os quais têm ganhado aceitação nas estratégias de biomonitoramento, fundamentalmente porque eles dão resultados seguros, sem custo efetivo, simples e rápido. Estes bioensaios podem auxiliar na avaliação dos efeitos na saúde (toxidade humana e animal) e dos efeitos ecológicos de milhares de substâncias tóxicas que

são introduzidas por várias vias no ambiente, e permitem sua aplicação em programas de monitoramento na avaliação da toxicidade. Nas últimas décadas foram desenvolvidos bioensaios rápidos com emprego de plantas como organismo teste, que funcionam como boa ferramenta de trabalho para o monitoramento ambiental (RODRIGUES, 2003).

Como parte integral do ecossistema, as plantas superiores são amplamente utilizadas por serem organismos eucarióticos, e por isso são comparáveis à maioria das espécies da flora e fauna superiores, e constituem uma eficiente ferramenta de trabalho para medir o perigo ambiental, além de possuir as seguintes vantagens:

- as plantas são mais sensíveis à estresse ambiental que outros sistemas de ensaios disponíveis;
- fácil manipulação e armazenagem;
- baixo custo;
- boa correlação com outros sistemas de teste.

Entre os testes com plantas, a curto prazo, o que mais se tem utilizado para avaliação toxicológica ambiental é a prova de toxicidade a curto prazo da prolongação da raiz de um vegetal. A justificativa para realizar este bioensaio se baseia na importância de eventos de desenvolvimento no crescimento e sobrevivência das plantas. O crescimento da raiz é inibido em concentrações baixas de substâncias tóxicas para germinação de sementes, portanto, a concentração pode ser o indicador mais sensível.

Este bioensaio pode ser executado com qualquer número de espécies que sejam economicamente importantes, facilmente disponíveis, germinem e cresçam rapidamente (RODRIGUES, 2003).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicum esculentum* (tomate), por isso mesmo muito usadas em biotestes de laboratório (RODRIGUES, 2003).

As sementes teste podem ser de espécies que se encontrem no local a campo. Como as espécies nativas, porém, possuem algum tipo de dormência, o uso de sementes de espécies cultivadas, de boa qualidade, é mais aconselhável.

Alface é a planta mais comum, como espécie alvo, para examinar alelopatia entre as hidrófitas, devido tanto ao pequeno período requerido para sua germinação (24 a 48 horas) quanto para seu crescimento. As reservas que a semente de alface possui, no entanto, não permitem um desenvolvimento expressivo da plântula sem uso de nutrientes externos, o que é uma limitação. Por outro lado, oferece uma vantagem extra de poder ser cultivada em soluções hidropônicas, o que pode ser manejado para exploração de algum problema de alelopatia (RODRIGUES, 2003).

O bioensaio com sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) é um ensaio estático de toxicidade aguda (120 horas de exposição) em que se avaliam os efeitos fitotóxicos de um composto puro ou de uma mistura complexa no processo de germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas durante os primeiros dias de crescimento (RODRIGUES, 2003).

Como ponto final para avaliação dos efeitos fitotóxicos, se determina a inibição da germinação e a inibição da prolongação da radícula e do hipocótilo. A diferença do bioensaio tradicional de germinação de sementes é que a avaliação do efeito na prolongação da radícula e do hipocótilo das plantas permite avaliar o efeito tóxico de compostos solúveis presentes em concentrações tão baixas que não são suficientes para inibir a germinação, mas que pode retardar ou inibir completamente os processos de prolongamento da raiz ou do hipocótilo, o que depende do modo e local de ação dos contaminantes (RODRIGUES, 2003).

Promovido pelo Centro Internacional para Desenvolvimento e Investigação do Canadá, no ano de 2000, se desenvolveu o denominado projeto *WaterTox,* que compreendeu instituições de diferentes países com o objetivo de desenvolver e avaliar uma bateria de bioensaios simples, baratos e práticos, com a finalidade de testar a toxicidade de amostras de água para consumo humano. Como parte dessa bateria de bioensaios, foram incorporadas tanto testes com *Lactuca sativa* L. como com *Allium cepa* L. o que validou a sua utilização como ferramenta na avaliação toxicológica de amostras ambientais (RODRIGUES, 2003).

Outro ensaio validado internacionalmente utiliza bulbos de cebola (*Allium cepa* L.), sendo este um bioensaio de toxicidade aguda (72 horas) semiestático (com renovação diária da solução de ensaio). Como ponto final de avaliação de efeitos fitotóxicos, a média de inibição é quantificada no comprimento das raízes do bulbo (RODRIGUES, 2003).

Este método é uma ferramenta fácil e sensível para a medição da toxicidade total causada por tratamentos com substâncias químicas. Os resultados deste ensaio são bem ajustados a uma bateria de testes composta por organismos procariontes e/ou eucariontes. É aplicável a águas naturais (lagos, rios e poços), água potável (água de torneira), águas residuais domésticas e industriais, inclusive lamas e lixiviados, substâncias químicas solúveis em água e substâncias químicas insolúveis em água e solventes.

O grau de toxicidade das substâncias químicas do teste é calculado pela medição do comprimento das raízes (10 cebolas são empregadas para cada concentração ou menos, dependendo da amostra). Para o relatório do teste, se usa um valor médio do crescimento para cada uma das séries.

Para Fiskesjö (1985) o emprego deste teste no monitoramento de águas residuais demonstra correlação alta com outros sistemas de ensaio, como os testes de toxicidade geral (crescimento das raízes) e o de genotoxicidade (aberrações cromossômicas) (RODRIGUES, 2003). Além dos bulbos, as sementes de cebola também têm sido utilizadas em testes de alelopatia.

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto, germina ou não germina. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Assim, a avaliação da normalidade das plântulas é um instrumento valioso. Quando os ensaios são realizados em placa de petri ou caixas tipo gerbox, a extensão da radícula, que deve ser no mínimo 50% do tamanho da semente (ou diásporo), é o critério usual para germinação. Usando rolo de papel ou solo, a visualização da radícula não é o critério utilizado para contabilizar a germinação. Para testes alelopáticos, recomenda-se o

critério morfológico de germinação, ou seja, emergência da radícula, como primeira abordagem, devendo ser seguido por testes de germinação em solo ou areia. Justamente por ser mais fácil a tomada de dados, existe extensa literatura apontando efeitos alelopáticos sobre a germinação (RICE, 1984; PUTNAM e TANG, 1986 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Entretanto, muitas vezes o efeito alelopático não é sobre a germinabilidade (percentual final de germinação no tempo) (LABOURIAU, 1983 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000), mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo (RODRIGUES, 2003). O efeito alelopático pode provocar alterações na curva de distribuição da germinação, que passa de distribuição normal para uma curtose, nas situações mais simples, até distribuições erráticas, alongando a curva através do eixo do tempo ou um padrão complexo de distribuição de germinação das sementes, devido ao ruído informacional (LABOURIAU e AGUDO, 1987 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Desta forma, o acompanhamento da germinação deve ser diário ou em tempos mais curtos que 24 horas. Estas alterações no padrão de germinação podem resultar de efeitos sobre: a permeabilidade de membranas; a transcrição e tradução do DNA; o funcionamento dos mensageiros secundários; a respiração, por seqüestro de oxigênio (fenóis); a conformação de enzimas e de receptores, ou ainda pela combinação destes fatores (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Os efeitos dos aleloquímicos sobre o crescimento da plântula, usando como substrato papel de filtro, são, em geral, muito mais drásticos, como se pode observar no caso da cultura de erva-mate. A incorporação de frutos de *Ilex paraguariensis* (erveira ou erva-mate) ao solo (não apenas extratos) também produziu efeitos significativos em vários parâmetros de crescimento do milho, mesmo após 60 dias de incorporação do material no solo. Interessante observação foi realizada por Weidenhamer *et al.* (1987 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000), que notaram uma redução no efeito alelopático quando um número maior de plântulas foi colocado na placa. O aumento do volume da substância alelopática nulificou este efeito, ou seja, o crescimento das radículas de *Cucumis sativus* foi proporcional ao fitotóxico disponível para cada semente. Portanto, deve-se cuidar da proporção entre o aleloquímico e o material biológico em teste (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

A maioria das pesquisas em alelopatia refere-se apenas ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, não considerando os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas no sistema da planta.

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outros, que são variáveis. Esses compostos possuem importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. Por outro lado, esses compostos, ao serem incorporados ao organismo animal, produzem variados efeitos e, quando benéficos, caracterizam as plantas que os possuem, denominando-as de ***plantas medicinais***.

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez o uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica (USP/ESALQ, 1999).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (CUNHA, 2005).

Por outro lado, a forma alarmante como se processa, em certas regiões, o extermínio de espécies vegetais, mesmo antes de serem investigadas química e farmacologicamente, justifica que se conceda prioridade a tais estudos. Vários investigadores têm feito importantes revisões sobre o uso medicinal e efeitos tóxicos de plantas, por populações não ocidentalizadas. Importante é, também, o trabalho de prospecção sobre milhares de extratos vegetais, em relação a uma possível

atividade antineoplásica e citotóxica, que tem sido levada a efeito pelo “U. S. National Cancer Institute” (CUNHA, 2005).

As plantas medicinais, que têm avaliadas a sua eficiência terapêutica e a toxicologia ou segurança do uso, dentre outros aspectos, estão cientificamente aprovadas a serem utilizadas pela população nas suas necessidades básicas de saúde, em função da facilidade de acesso, do baixo custo e da compatibilidade cultural com as tradições populares. Uma vez que as plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, a lei permite que sejam comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por aqueles que disponham de condições mínimas necessárias. Com isto, é facilitada a automedicação orientada nos casos considerados mais simples e corriqueiros de uma comunidade, o que reduz a procura pelos profissionais de saúde, facilitando e reduzindo ainda mais o custo do serviço de saúde pública (LAPA *et al.,* 2003).

O *Rosmarinus officinalis* L. pertencente à família Lamiaceae é uma planta lenhosa de porte ereto, pouco ramificado de pequeno porte, podendo chegar ate 1,5m. Suas folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas de odor característico, medindo 1,5 a 4cm de comprimento por 1 a 3mm de espessura. Apresenta flores azulado-claras, pequenas e de aroma acentuado e muito agradável. É nativa da região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado de Portugal à Austrália. Existem mais de 10 variedades em cultivo desta planta, todas para o mesmo uso, porém com aromas diferentes (LORENZI & MATOS, 2002).

Sua aplicação pode ser através do uso das folhas, flores e frutos secos e triturados que formam uma excelente mistura para uso como tempero de carnes e massas. Seu uso medicinal é referido na literatura etnofarmacológica, que cita o emprego de suas folhas na medicina tradicional de vários países na forma de chá do tipo infusão.

O estudo das informações sobre esta planta permitiu selecioná-la como indicação aceita internacionalmente, no tratamento caseiro nos casos de hipertensão, problemas digestivos, perda de apetite e, externamente, nos sintomas, de reumatismo. Ensaios farmacológicos comprovaram suas propriedades

espasmóticas sobre a vesícula e o duodeno, colerética, protetora hepática, e antitumoral.

Esta espécie pode também apresentar efeitos alelopáticos, pois a análise fotoquímica registrou para suas folhas a presença de óleo essencial constituído de uma mistura de componentes voláteis que é responsável pelo seu odor típico, dentre os quais os principais são borneol, cineol, alfa-pineno, ácido rosmarínico e cânfora e, entre os compostos não voláteis, o ácido caféico, saponinas, diterpenos amargos, flavonóides e triterpenóides (Tab.1).

Cineol possui ação cardíaca indesejável, já os compostos fenólicos do óleo volátil de alecrim proporcionam atividade antiespasmódica e coleréticas quando em infusão. Pesquisas mostram que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como anti-virais, anti-hemorrágicos, hormonais, antiinflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes.

A presença de saponinas, que possuem a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão a atividade molusquicida, freqüentemente observadas. As saponinas também apresentam atividade antiinflamatória, antiviral e hipocolesterolemiante, entre outras.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarréia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SANTOS & MELLO, 2003).

Diferentes princípios ativos são obtidos de acordo com o método de extração escolhido. A técnica de extração de aleloquímicos consiste em mergulhar o material fresco ou seco em um solvente por um determinado período de tempo e, após filtração, obtém-se o extrato. Esses extratos podem ser feitos com toda planta ou órgãos, inteiros ou triturados. O solvente mais utilizado nas extrações é a água

destilada seguido por solventes orgânicos de vários graus de polaridade (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 2003).

A extração pode ser a quente em sistemas abertos, como a infusão, onde a extração se dá pela permanência, durante certo tempo, do material vegetal em água fervente, num recipiente tapado. A infusão é aplicável a partes vegetais de estrutura mole, as quais devem ser contundidas, cortadas ou pulverizadas grosseiramente, conforme a sua natureza, a fim de que possam ser facilmente penetradas e extraídas pela água; ou decocção que consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição. É uma técnica de emprego restrito, pois muitas substâncias ativas são alteradas por um aquecimento prolongado e costuma-se empregá-la com materiais vegetais duros e de natureza lenhosa.

Pode-se também utilizar a extração a frio, como a maceração, na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator.

As drogas vegetais mais indicadas para serem extraídas por maceração são aquelas ricas em substâncias ativas que não apresentam uma estrutura celular, como gomas, resinas e alginatos (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 2003).

O emprego de extrato aquoso em testes alelopáticos tem como objetivo procurar simular o que acontece na natureza. Muitas substâncias químicas ou aleloquímicos, que se encontram em plantas vivas, ou resíduos, geralmente são lixiviadas em quantidades significativas pela chuva e orvalho para o solo (SANTOS *et al.*, 2002).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Experimento 1: Uso de sementes de cebola como bioensaio

5.1.1. Material botânico

Foram utilizadas sementes de cebola obtidas no comércio local, com poder germinativo inicial de 78%, dentro do prazo de validade.

5.1.2. Obtenção dos extratos aquosos de alecrim

5.1.2.1. Por decocção

Os extratos aquosos foram preparados fervendo-se folhas frescas em água destilada (AD) por 10min. Após, a solução foi coada e resfriada a temperatura ambiente. As concentrações finais de 15, 30 e 60mg/mL foram obtidas por diluição e utilizada água destilada como controle negativo, sendo a concentração de 30mg/mL recomendada popularmente para o uso.

5.1.2.2. Por infusão

Os extratos aquosos foram preparados fervendo-se água destilada e adicionando sobre folhas frescas. O recipiente foi fechado e mantido a temperatura ambiente por 10min, posteriormente a solução foi coada. Obteve-se por diluição, as concentrações de 15, 30 e 60mg/mL, e água destilada (AD) como controle negativo.

5.1.2.3. Por maceração

Os extratos aquosos foram preparados por maceração das folhas frescas em água destilada (AD) por 12h, obtendo-se, por diluição, as concentrações de 15, 30 e 60mg/mL, e utilizada água destilada (AD) como controle negativo.

5.1.3. Germinação

As sementes de cebola foram colocadas para germinar em placas contendo papel germiteste, embebidos nas diferentes concentrações do extrato e AD (controle). Foram realizados três blocos de quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, totalizando 12 placas para cada concentração. As sementes foram mantidas em germinador com temperatura controlada de 20 °C ± 1°C ao longo da avaliação.

Para o experimento com extrato obtido por maceração as sementes foram acondicionadas em gerbox, utilizando-se quatro repetições com 100 sementes por tratamento, sendo as demais condições mantidas iguais as anteriores.

5.1.4. Avaliação de germinabilidade

Para cebola as avaliações realizadas foram a de 1ª contagem no 6º dia e o teste de germinabilidade com a contagem do total de sementes germinadas após 12 dias, de acordo com as Regras de Análise se Sementes (BRASIL, 1992).

5.1.5. Análise do índice mitótico (IM)

Para avaliação do IM, pontas de raízes foram coletadas com 5,0 a 10,0mm de comprimento. Para análise do índice mitótico, foi observado que o dia da coleta das pontas de raízes meristemáticas recomendado pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992), pode ser adiantado para até o 4º dia de germinação. Isso

se deve ao fato das raízes atingirem um tamanho superior a 10,0mm quando atingem o 6º dia, dessa forma acabam dificultando a análise da divisão celular.

As pontas coletadas foram fixadas em Carnoy (3 álcool etílico:1 ácido acético), mantidas em temperatura ambiente por 24h e após colocadas em freezer até a confecção de lâminas. Posteriormente, foram hidrolisadas em HCl 5N e coradas com orceína acética 2%, sendo realizada contagem de 2000 células/tratamento em microscópio óptico numa magnitude de 500x usando óleo de imersão. As análises estatísticas realizadas foram análise de variância e o desdobramento de médias pelo teste de Duncan utilizando o pacote estatístico SANEST. Os dados de germinação e índice mitótico foram previamente transformados segundo raiz quadrada de x/k (k= 100).

5.2. Experimento 2: Uso de sementes de alface como bioensaio

5.2.1. Material botânico

Foram utilizadas sementes de alface obtidas no comércio local, com poder germinativo inicial de 98%, dentro do prazo de validade.

5.2.2. Obtenção dos extratos aquosos de alecrim

5.2.2.1. Por decocção

Os extratos aquosos foram preparados fervendo-se folhas frescas em água destilada (AD) por 10min. Após, a solução foi coada e resfriada a temperatura ambiente. As concentrações finais de 15, 30 e 60mg/mL foram obtidas por diluição e utilizada água destilada como controle negativo, sendo a de 30mg/mL recomendada popularmente para o uso.

5.2.2.2. Por infusão

Os extratos aquosos foram preparados fervendo-se água destilada e adicionando sobre folhas frescas. O recipiente foi fechado e mantido a temperatura ambiente por 10min, posteriormente a solução foi coada. Obteve-se por diluição, as concentrações de 15, 30 e 60mg/mL, e água destilada (AD) como controle negativo.

5.2.3. Germinação

As sementes de alface foram colocadas para germinar em gerbox contendo papel germiteste, embebidos nas diferentes concentrações do extrato e AD (controle). No experimento com extrato obtido por infusão as sementes foram acondicionadas em gerbox utilizando-se 4 repetições de 100 sementes por tratamento. Para o experimento utilizando extrato obtido por decocção foram realizados três blocos de quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, totalizando 12 placas para cada concentração. As sementes foram mantidas em germinador com temperatura controlada de 20 °C $\pm$ 1°C ao longo da avaliação.

5.2.4. Avaliação de germinabilidade

Para alface as avaliações realizadas foram a de 1ª contagem no 4º dia e o teste de germinabilidade com a contagem do total de sementes germinadas após 7 dias, de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

5.2.5. Análise do índice mitótico (IM)

Para avaliação do IM, pontas de raízes foram coletadas com 5,0 a 10,0mm de comprimento. Para análise do índice mitótico, foi observado que o dia da coleta das pontas de raízes meristemáticas recomendado pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992), sendo que nas sementes de alface pode ser adiantado para até o 3º dia de germinação. Isso se deve ao fato das raízes atingirem um

tamanho superior a 10,0mm quando atingem o 4º dia, dessa forma acabam dificultando a contagem da divisão celular.

As pontas coletadas foram fixadas em Carnoy (3 álcool etílico:1 ácido acético), mantidas em temperatura ambiente por 24h e após colocadas em freezer até a confecção de lâminas. Posteriormente, foram hidrolisadas em HCl 5N e coradas com orceína acética 2%, sendo realizada contagem de 2000 células/tratamento em microscópio óptico numa magnitude de 500x usando óleo de imersão. As análises estatísticas realizadas foram análise de variância e o desdobramento de médias pelo teste de Duncan utilizando o pacote estatístico SANEST. Os dados de germinação e índice mitótico foram previamente transformados segundo raiz quadrada de x/k (k= 100).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1: Uso de sementes de cebola como bioensaio

De acordo com os dados obtidos quando utilizou-se sementes de cebola e extrato aquoso de alecrim, obtido por decocção, não observou-se diferença estatisticamente significativa para o percentual de germinação obtido na primeira contagem, aos 6 dias, entre as diferentes doses utilizadas (60, 30, 15mg/mL), porém estes diferiram do controle com 9, 8, 7 e 4%, respectivamente ($p<0,05$) (Fig. 1).

Esse resultado demonstra que o extrato obtido por decocção atuou acelerando a germinação sobre sementes de cebola. Alguns trabalhos demonstraram que compostos vegetais podem atuar promovendo o crescimento (Yamada *et al.* 1995; Yokotani-Tomita *et al.* 1998). De acordo com Rice (1984 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000) e Gatti, Peres & Lima (2004) aparentemente, a maior parte, senão todos os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, são estimulantes quando presentes em menores concentrações, sendo talvez as concentrações do decocto utilizadas baixas para causarem inibição.

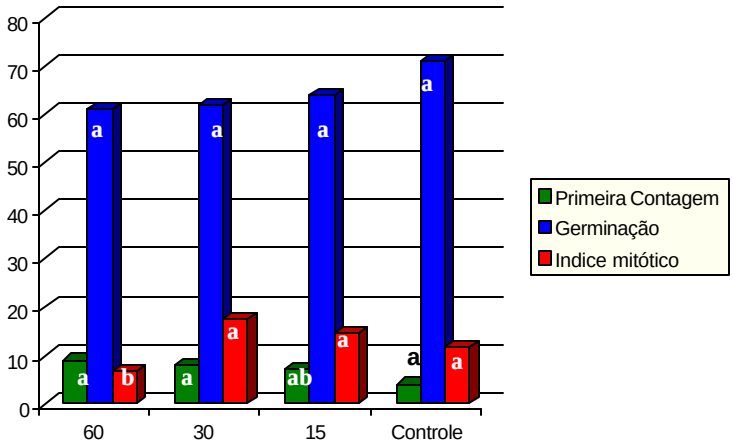
Quando avaliado o percentual total de germinabilidade, aos 12 dias, esta diferença em relação ao controle não foi observada, obtendo-se percentual de 61; 62, 64 e 71% de germinação para as concentrações de 60, 30, 15mg/mL e o controle respectivamente ($p>0,05$) (Fig.1).

Estes resultados estão de acordo com as citações de Rodrigues (2003) quando descreve que, muitas vezes, o efeito aleopático é mais visível sobre a velocidade de germinação do que sobre a germinabilidade.

Através dos resultados observados na figura 1, o índice de divisão mitótica analisado mostrou um efeito significativo ($p<0,05$), havendo uma redução da divisão

celular (6,8%) naquelas células meristemáticas radiculares de sementes de cebola submetidas a concentração mais alta (60mg/mL), sendo que as demais doses não diferiram em relação ao controle (17,6; 14,7 e 11, 6% no controle). Souza *et al.* (2004) verificaram resultados semelhantes nas concentrações mais altas de decocto de espinheira-santa em sementes de cebola.

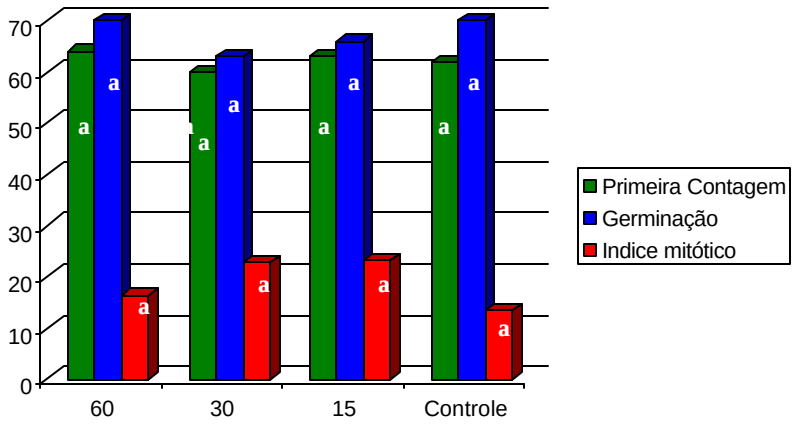
Pires *et al.* (2001) utilizando extrato de leucena verificaram que com o aumento da concentração o valor do índice mitótico foi continuamente reduzido. com paralisação do crescimento radicular. Neste experimento observamos redução do índice mitótico mas não houve diminuição significativa na germinação.



* Letras distintas entre tratamentos dentro das mesmas variáveis diferem entre si pelo teste de Duncan.

Figura 1 - Avaliação do efeito do decocto de alecrim sobre a germinação na primeira contagem, percentual total de germinação e índice mitótico em sementes de cebola.

O efeito do extrato aquoso obtido por infusão sobre as variáveis testadas pode ser observado na figura 2. De acordo com os dados obtidos quando utilizou-se sementes de cebola tanto para o percentual de germinação na primeira contagem, como para germinação e índice mitótico as diferentes concentrações não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0.05$).



* Letras distintas entre tratamentos dentro das mesmas variáveis diferem entre si pelo teste de Duncan.

Figura 2 - Avaliação do efeito da infusão de alecrim sobre a germinação na primeira contagem, percentual total de germinação e índice mitótico em sementes de cebola.

Resultados obtidos por Iganci *et al.* (2003) utilizando extratos de boldo, guaco e macela, obtidos por infusão, sobre sementes de cebola mostraram que na primeira contagem o percentual de germinação foi de 41.5, 14.0 e 23.0%, respectivamente e apenas 10% no controle. Na germinação total, as sementes em boldo apresentaram 50.5% de germinação e as sementes em guaco e macela 29.5 e 42.5%, respectivamente, sendo o controle 58%. Estes resultados corroboram os obtidos neste ensaio verificando que a germinação final pode não ser um bom indicador para extratos obtidos por infusão.

Segundo Labouriau (1983 apud FERREIRA & ÁQUILA, 2000), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, entretanto, muitas vezes o efeito alelopático não é sobre a germinabilidade (percentual final de germinação no tempo), mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo (RODRIGUES , 2003).

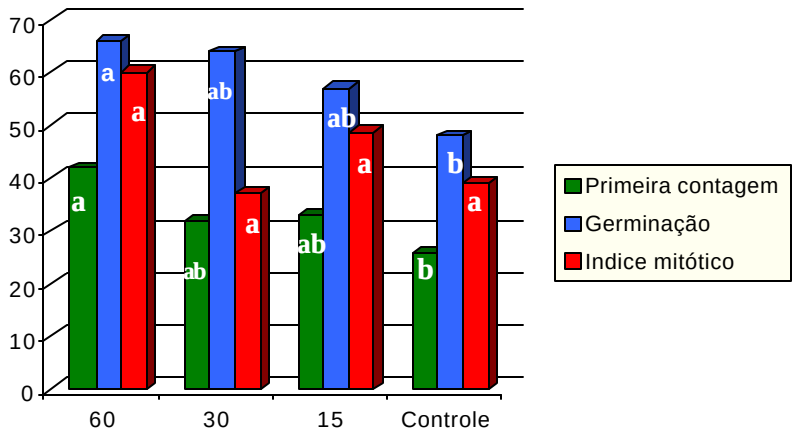
Conforme mostrado na figura 3, o extrato obtido pelo processo de maceração influenciou positivamente a germinação na primeira contagem (p=0,05) das sementes de cebola. Houve diferença significativa entre a concentração de 60mg/mL e o controle, sendo os valores obtidos de 42 e 26% respectivamente. As

concentrações de 15 e 30 mg/mL (33 e 32%) não apresentaram diferença significativa entre elas e entre os valores da maior concentração e do controle.

Na germinação observamos que houve diferença estatística entre as duas maiores concentrações (66 e 64%) e o controle (48%) demonstrando que o efeito da maceração potencializa o processo germinativo ($p<0.01$) (Fig.3).

O desdobramento das médias pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade não indicou diferença entre as concentrações usadas e o controle para a análise do índice de divisão mitótica.

O extrato obtido por maceração apresenta resultados diferentes daqueles obtidos para a infusão e o decoto. Reigosa *et al.* (1999) afirmou que os aleloquímicos podem atuar em vários processos simultaneamente e ter uma resposta diferenciada para o mesmo ou para diferentes processos, dependendo da concentração deste composto (GATTI, PERES & LIMA, 2004). O tipo de extração pode contribuir para o tipo de substância extraída e a concentração do aleloquímico na solução.



* Letras distintas entre tratamentos dentro das mesmas variáveis diferem entre si pelo teste de Duncan.

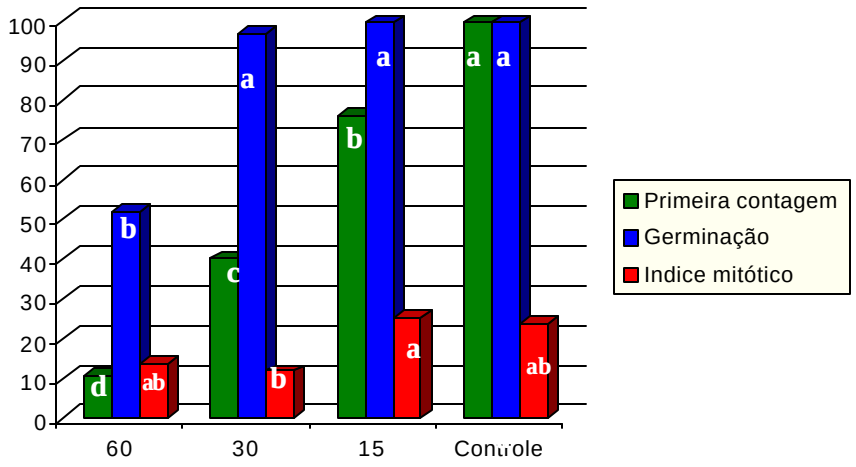
Figura 3 - Avaliação do efeito da maceração de alecrim sobre a germinação na primeira contagem, percentual total de germinação e índice mitótico em sementes de cebola.

6.2. Experimento 2: Uso de sementes de alface como bioensaio

Verificou-se nas sementes de alface submetidas ao extrato de alecrim obtido por decocção diferenças significativas com relação à avaliação da primeira contagem entre as três concentrações analisadas (60, 30 e 15mg/mL) e o controle que apresentaram os seguintes resultados: 11, 40, 76 e 100% (Fig. 4).

A germinabilidade apresentou diferença na maior concentração quando comparado com a demais e o controle, 52, 97, 100 e 100%, respectivamente, ao nível de significância de 1% indicando efeito inibitório sobre sementes de alface (Fig.4).

Nos resultados obtidos para o índice de divisão celular não houve diferença significativa (13.9, 11.6, 25.0 e 23.6), conforme figura 4.



* Letras distintas entre tratamentos dentro das mesmas variáveis diferem entre si pelo teste de Duncan.

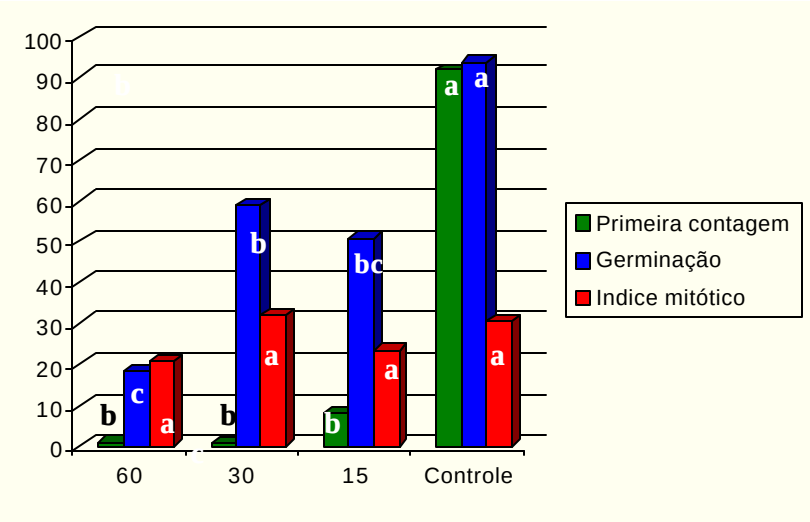
Figura 4 - Avaliação do efeito da decocção de alecrim sobre a germinação na primeira contagem, percentual total de germinação e índice mitótico em sementes de alface.

A figura 5 permite visualizar o efeito inibitório da infusão de alecrim em sementes de alface, para a variável primeira contagem demonstrou significância entre o uso da infusão com relação ao controle (1, 0.6, 8 e 92% não diferindo entre as doses do extrato).

Na variável germinação houve diferença estatística do controle com relação às concentrações usadas (18, 59, 51 e 94%) sendo que a dose de 15mg/mL não diferiu da dose de 30 e de 60mg/mL (Fig.5). No Índice mitótico não se verificou diferenças significativas entre as concentrações utilizadas e o controle (Fig.5).

Utilizando o mesmo organismo teste Alves, Medeiros-Filho & Torres (2003_b) observaram inibição de 100% da germinação de sementes e do crescimento da raiz de plântulas de alface a partir da concentração de 0.1% para os óleos de canela, alecrim-pimenta e capim citronela demonstrando forte efeito alelopático. Outros autores observaram o mesmo efeito utilizando óleo de eucalipto (BORGES *et al.*, 2003) e alecrim-pimenta (GADELHA *et al.*, 2003), resultados que diferem dos observados neste ensaio.

Porém, os resultados de Nascimento *et al.* (2003), que testaram o efeito do óleo essencial de capim santo na germinação e vigor de sementes de alface, mostraram que à medida que se aumentava a concentração do óleo maior era a inibição da germinação, resultados similares aos deste ensaio para primeira contagem que determina vigor das sementes.



* Letras distintas entre tratamentos dentro das mesmas variáveis diferem entre si pelo teste de Duncan.

Figura 5 - Avaliação do efeito da infusão de alecrim sobre a germinação na primeira contagem, percentual total de germinação e índice mitótico em sementes de alface.

Os percentuais de germinação observados na primeira contagem por Stein *et al.* (2004) indicaram um efeito alelopático crescente sobre as sementes de alface, conforme aumento da concentração do extrato de infusão de tansagem. Mas, através do teste de germinação, foi observada uma redução do efeito alelopático, com uma retomada do processo germinativo das sementes. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o Índice mitótico.

Segundo Rodrigues (2003), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas. Entretanto, mesmo observando uma influência inibitória dos extratos de alecrim sobre a primeira contagem de germinação em alface não foram observadas alterações sobre o índice mitótico, talvez por isso, não tenha afetado a germinação total.

Com os resultados obtidos utilizando-se as mesmas concentrações do extrato de alecrim e a mesma forma de obtenção do extrato, a alface mostrou-se um organismo teste mais sensível que as sementes de cebola para detectar influência dos extratos sobre o vigor das sementes. Isto corrobora o fato de a alface ser a planta mais comum como espécie alvo para examinar alelopatia e também de o efeito alelopático não ser sobre a germinabilidade mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo (RODRIGUES , 2003).

Mesmo assim, de acordo com Souza Filho *et al*. (1997) e Pires *et al.* (2001), a interferência no desenvolvimento da radícula é um dos melhores indicadores para o estudo de extratos com potencial alelopático.

Para alface, tanto os extratos obtidos através do sistema de infusão ou de decocção não mostraram efeitos diferentes. Resultados estes diferentes daqueles obtidos para cebola onde foram observados resultados distintos conforme o tipo de extrato obtido.

Alguns autores como Medeiros (1990 apud PIÑA-RODRIGUES & LOPEZ, 2001) descrevem como os produtos químicos mais comuns, causando efeitos alelopáticos, os pertencentes aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido

benzóico, taninos e quinonas complexas. Segundo Almeida (1988, 1993), a obtenção destes produtos no extrato depende do método utilizado e que a ação das substâncias aleloquímicas não é muito específica, podendo uma mesma substância desempenhar várias funções, dependendo de sua concentração e forma de translocação em diferentes espécies (PIÑA-RODRIGUES & LOPEZ, 2001).

7. CONCLUSÕES

As sementes de alface foram mais sensíveis ao efeito dos extratos de alecrim do que as sementes de cebolas, principalmente para a variável primeira contagem.

O tipo de extrato utilizado só apresentou diferenças quando utilizado em sementes de cebola.

O extrato obtido por maceração potencializa o processo de germinação de sementes de cebola