

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULANTE DE EXTRATOS DE CROTALÁRIA, OBTIDOS A PARTIR DE DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Stéphani Patel Pasqualotto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Gabriel Felipe Stulp, Gislaine Cristiane Mantovanelli, Márcio Shigueaki Mito, Isabela Ferreira Henrique, Larissa Ayumi Kajihara, Emy Luiza Ishii Iwamoto (Orientador). E-mail: eliiwamoto@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Bioquímica/Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: planta de cobertura, sonicação, estresse, crescimento, *Zea mays*, *Amaranthus hybridus*.

RESUMO

Estudos anteriores revelaram que extratos obtidos de partes aéreas de crotalária exercem efeito bioestimulante. O objetivo desse trabalho foi testar duas técnicas de extração das substâncias ativas de duas espécies de crotalária, a *Crotalaria spectabilis* (CS) e a *Crotalaria ochroleuca* (CO) visando um maior rendimento. O melhor método de extração com base na recuperação de glicose e ácidos fenólicos foi o de maceração do material vegetal em meio aquoso, sob agitação por 4 horas, quando comparado com a sonicação da suspensão vegetal por diferentes tempos e potências. Os extratos exerceram forte efeito bioestimulante em *A. hybridus*, mas não em *Zea mays*, possivelmente devido às diferenças anatômicas e fisiológicas entre as mono e as eudicotiledôneas.

INTRODUÇÃO

Os estresses de natureza abiótica ou biótica presentes no campo impedem que as culturas expressem o máximo potencial produtivo. Dentre as soluções disponíveis para melhorar a resiliência das culturas aos estresses está a aplicação de bioestimulantes. Um bioestimulante é qualquer composto natural que, quando aplicado nas plantas, sementes ou rizosfera, estimula processos fisiológicos da cultura, melhorando a eficiência na utilização de nutrientes e/ou a tolerância aos estresses. Estudos anteriores revelaram que os extratos das partes aéreas de *Crotalaria spectabilis* estimulam o desenvolvimento de algumas espécies, indicando um potencial uso como bioestimulante (Wagner, 2021). Para essa finalidade é desejável que uma maior quantidade de substâncias ativas sejam extraídas do material vegetal. As técnicas clássicas para extração são a extração com o Soxhlet, maceração e extração sequencial com solventes de diferentes polaridades, tais como diclorometano, hexano, acetato de etila, butanol, além da água (Azmir et al., 2013). Uma técnica alternativa é a extração ultrassônica, na qual o material triturado em uma suspensão é submetido a ondas sonoras de frequências superiores a 20 kHz, por meio de um sonificador. Essas ondas promovem agitação da solução,

dissociando a parede e outras partes celulares, o que pode aumentar a eficiência de extração de alguns compostos. (Azmir et al., 2013). Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a eficiência da extração dos compostos ativos de duas espécies de crotalária, a *C. spectabilis* e *C. ochroleuca* por dois métodos considerados de tecnologia verde, isto é, sem resíduos químicos ou de qualquer natureza sintética. Os efeitos do extrato obtido com maior rendimento foram testados sobre a *Amaranthus. hybridus* e *Zea mays*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do extrato aquoso de CS e CO: Os extratos aquosos de CS e CO foram obtidos por dois métodos: 1) pela utilização de um sonificador de ponteira ultrassônica (Ultronique- QR 800 W) no qual a razão sólido/líquido foi de 1:25, isto é, 4 g de palhada seca finamente triturada das partes aéreas de CS ou CO para 100 mL de água destilada. Foram ajustadas as variáveis de potência do equipamento e tempo de extração, entre 30 e 70% e 2 a 8 min, respectivamente; 2) pela maceração e extração do material vegetal em solução aquosa e agitação da suspensão por várias horas numa agitadora orbital (Tecnal TE-0532). Foi utilizada a mesma razão sólido/líquido de 1:25. Amostra de 40 g de palhada seca de CS ou CO foram adicionadas a 1L de água destilada e mantidas por 4 h, sob agitação constante (200 rpm). Em ambas as técnicas os extratos foram filtrados em gaze, centrifugados a 3000 g, a 4°C, e o sobrenadante resultante foi liofilizado.

Avaliação do conteúdo de glicose e fenólicos totais. A glicose foi dosada pelo método da orto-toluidina (Dubowski, 1962), adicionando em tubos com rosca 200 µL do extrato aquoso ou padrão de glicose 0,5 mM e 400 µL do reativo da orto-toluidina. Após aquecimento a 96 °C, por 10 min, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 625 nm. A quantificação de compostos fenólicos foi realizada segundo Singleton e Rossi (1965) incubando 5 mL dos extratos com 0,75 mL de carbonato de sódio 1,9 M e 0,25 mL do reativo de Folin 1M, por 60min, no escuro. A absorbância foi determinada a 760 nm, e a concentração calculada por meio de uma curva padrão de ácido ferúlico (0 a 120 µM).

Germinação e crescimento de *Z. mays* e *A. hybridus*. O milho foi semeado entre duas folhas de papel germitest, com 2,5 vezes o peso do papel em água (controle) ou soluções do extrato aquoso de CS e CO (250 a 4000 µg/mL), formando rolinhos que foram mantidos por 5 dias, a 25°C, em fotoperíodo de 12 horas. A *A. hybridus* foi germinada em placas gerboxes, com 2 papéis germitest e 10 mL de água ou solução de CS e CO (250 a 4000 µg/mL). As gerboxes foram incubadas por 7 dias, em germinadora, com fotoperíodo de 8h claro (30°C) e 16h escuro (20°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de recuperação de compostos fenólicos e de glicose das duas espécies de crotalária, utilizando as duas técnicas, foi muito semelhante (Figura 01). A maior recuperação foi a partir da maceração do material em água e sob agitação constante (M), se comparada com a sonicação da solução aquosa nas diferentes

potências e tempos aplicados (1 a 7). A diferença foi maior para os fenólicos do que para a glicose. A glicose é mais solúvel em água do que os compostos fenólicos. Assim esses resultados indicaram que ambos os processos foram eficientes na extração de compostos bem solúveis, e que a sonicação não melhorou a solubilização dos compostos fenólicos, que ao contrário foi menor. Assim, o processo M passou a ser usado para obtenção dos extratos aquosos de crotalária e para os testes biológicos.

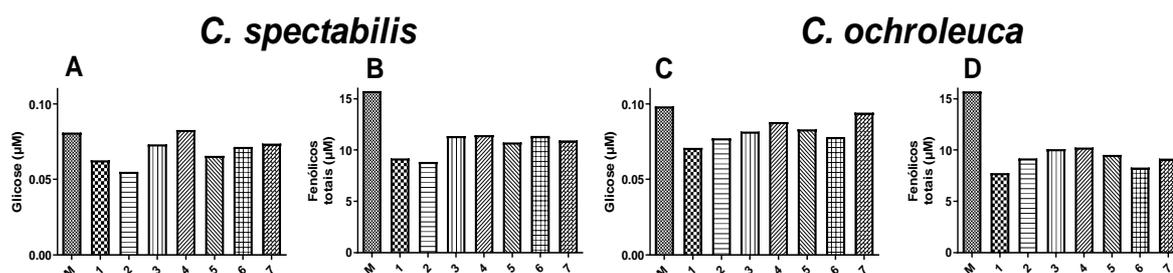


Figura 1 - Conteúdo de glicose (A e D) e de fenólicos totais (B e D) nos extratos de CS e CO obtidos a partir da maceração e agitação (M) ou por sonicação por 2 min e potência (P) 30% (1), sonicator por 2 min e P 70% (2), sonicator por 8 min e P 30% (3), sonicator por 8 min e P 70% (4), sonicator por 5 min e P 50% (5), sonicator por 5 min e P 50% (6), sonicator por 5 min e P 50% (7).

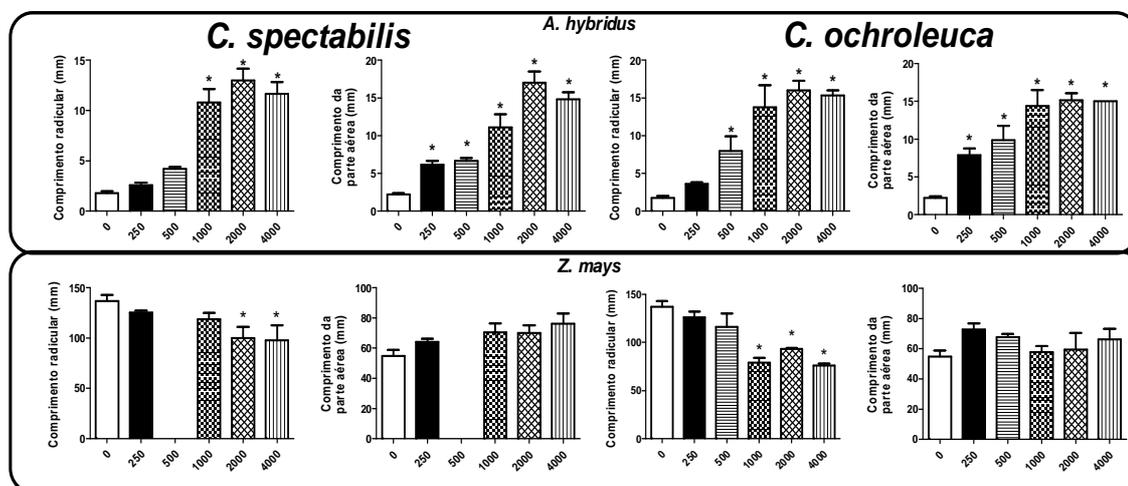


Figura 2 - Parâmetros biométricos de *A. hybridus* e *Z. mays* crescidas na presença do extrato aquoso de CS e CO na faixa de concentração de 250 a 4000 µg/mL. Colunas com o "*" acima indicam diferença estatística significativa em relação ao controle, segundo análise de variância com teste de Duncan.

A Figura 2 mostra os resultados dos efeitos do extrato M em *A. hybridus* e *Z. mays* nas doses de 250 a 4000 µg/mL. Em *A. hybridus* houve um aumento acentuado e dose-dependente no crescimento, tanto da parte radicular quanto da parte aérea, e que foram semelhantes para as duas espécies. O efeito máximo já foi alcançado na dose de 1000 µg/mL, com aumento no tamanho das plântulas de cerca de 5 a 6 vezes comparadas com o controle. Por outro lado, nessas mesmas doses em *Z. mays*, não foram observados efeitos estimulatórios significativos, mas,

ao contrário, reduções no tamanho das radículas nas doses maiores. A diferença nos efeitos entre as duas espécies está possivelmente relacionada ao fato do milho ser uma planta monocotiledônea, enquanto que a *A. hybridus* é uma eudicotiledônea. O sistema de vasos condutores das monocotiledôneas está difuso no parênquima, sendo menos desenvolvido se comparado com as eudicotiledôneas. É possível que a absorção e a translocação dos compostos ativos dos extratos de CS e CO tenham sido bem menores, não alcançando os alvos celulares que levam ao estímulo no desenvolvimento das plântulas, possivelmente relacionados com as ações dos fitormônios. Há de fato relatos que alguns bioestimulantes usados no tratamento de sementes são pouco efetivos em milho, não garantindo benefícios à cultura (Gonzaga et al., 2023). Efeitos de estímulo foram observados em outras eudicotiledôneas testadas no Laboratório, tais como *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula) (dados não mostrados), corroborando a seletividade de ação entre as classes de plantas.

CONCLUSÕES

A extração das substâncias solúveis da CS e CO pelo método de maceração do material vegetal em meio aquoso, com agitação por 4 horas, foi mais efetivo do que pelo processo de sonicação. Os extratos de ambas as espécies estimularam fortemente o desenvolvimento de plântula de *A. hybridus*, mas não de *Z. mays*, sugerindo um efeito bioestimulante seletivo sobre eudicotiledôneas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio financeiro do CNPq, pela bolsa concedida, à Universidade Estadual de Maringá pelo apoio técnico e teórico, e ao laboratório de Oxidações Biológicas e seus integrantes pela orientação e suporte para realizar o trabalho.

REFERÊNCIAS

- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- DUBOWSKI, K. M. An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. **Clinical chemistry**, v. 8, n. 3, p. 215–235, 1962
- GONZAGA, B. A et al. Tratamento de sementes de milho com bioestimulante. **Brazilian Journal of Science**, v. 2, n. 3, p. 46–53, 2023.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- WAGNER, A. L. S. Estudo do modo de ação de extratos de *Crotalaria spectabilis* e da protodioscina em plantas daninhas, e do resveratrol em *Lactuca sativa*. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá. 2021.