

## ESPÉCIES DE TREVO E SEU POTENCIAL ALELOPÁTICO SOBRE SEMENTES DE MILHO

Douglas Junior Bertoneceli<sup>1</sup>, Sergio Miguel Mazarro<sup>2</sup>, Pedro Válerio Dutra de Moraes<sup>2</sup>,  
Guilherme Augusto Cito Alves<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Freiria<sup>1</sup>, Felipe Favoretto Furlan<sup>1</sup>,  
André Prechlak Barbosa<sup>1</sup>, José Henrique Bizzari Bazzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina PR. E-mail: dj\_bertoneceli@hotmail.com, guilhermecito@hotmail.com, gustavo-freiria@hotmail.com, ffavorettofurlan@gmail.com, andreprechlak@gmail.com, agro.bazzo@gmail.com

<sup>2</sup>Professor do Programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos PR. E-mail: sergio@utfpr.edu.br, pvdmoares@gmail.com

*RESUMO: O objetivo foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos, obtidos de diferentes formas, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes de milho. Avaliou-se os extratos obtidos por infusão, maceração e alcoólico das espécies de trevo branco, vermelho e vesiculoso, em quatro concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 %) e a testemunha (água destilada). Foram semeadas 100 sementes em cada rolo de papel germiteste, os quais foram umedecidos com os diferentes extratos, de acordo com os tratamentos. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente e no final do experimento (10 dias), foi mensurado o índice de velocidade de germinação (IVG) e o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA), massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA). Para amparar os resultados obtidos, também foi realizado o espectro de infravermelho dos extratos. Observou-se que todos os extratos apresentaram efeito sobre as sementes de milho, causando redução da germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA. O extrato que causou maior efeito alelopático foi alcoólico de trevo branco. Analisando os espectros foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos.*

*PALAVRAS-CHAVE: aleloquímicos; leguminosas; Trifolium sp.; Zea mays.*

## CLOVER SPECIES AND THEIR ALLELOPATHIC POTENTIAL OF CORN SEEDS

*ABSTRACT: The objective was to evaluate the allelopathic effects of different concentrations of clover extract, obtained in different ways, on the germination and initial growth of corn seeds. We evaluated the extracts obtained by infusion, maceration and alcoholic species of white clover, red and vesicular, in four concentrations (2.5, 5.0, 7.5 and 10%) and the control (distilled water). 100 seeds were sown in each germitest paper roll, which were moistened with the different extracts, according to the treatments. Germination was assessed daily and at the end of the experiment (10 days), measured the speed of germination index (SGI) and the root length (RL) shoot (SL), root dry weight (RDW) and (RDS). To support these results, we also carried out infrared spectrum of the extracts. It was observed that all extracts showed effect on corn seeds, causing reduction in germination, SGI, RL, SL, RDW, SDW. The extract caused greater allelopathic effect was alcoholic white clover. Analyzing the spectra we observed the presence of phenolic compounds in all extracts.*

*KEYWORDS: legumes; allelochemicals; Trifolium sp., Zea mays.*

## INTRODUÇÃO

Na região sul do Brasil, o sistema de semeadura mais utilizado pelos agricultores é a semeadura direta, onde a decomposição da palhada libera compostos aleloquímicos, podendo interferir tanto no desenvolvimento de plantas daninhas quanto das grandes culturas (Tokura e Nóbrega, 2005).

Dentre as várias espécies de cobertura vegetal utilizadas no sistema de semeadura direta, as leguminosas tem se destacado cada vez mais, especialmente antecedendo a cultura do milho, pelo fato de possuírem a capacidade de fixar nitrogênio no solo (Spiassi et al., 2011), melhorando assim as características químicas físicas e biológicas do solo.

Dentre as espécies leguminosas utilizadas como cobertura vegetal, os trevos, tem despertado interesse por apresentarem características agronômicas desejáveis como, tolerância a geadas e a seca moderada, de fácil estabelecimento, apresentar ressemeadura natural e fixar nitrogênio atmosférico no solo. Além de sua grande diversidade de substâncias químicas, entre esses metabólitos, a classe dos flavanóides, os quais apresentam expressiva atividade biológica (Taiz e Zeiger, 2013) e ação alelopática (Verdi et al., 2005).

A dificuldade em desenvolver experimentos controlados e isentos de influências químicas externas se torna um dos principais obstáculos no estudo da alelopatia. Isso limita o conhecimento a respeito do mecanismo pelo qual as substâncias alelopáticas causam fitotoxicidade (Weir et al., 2004). A interação com o ambiente pode favorecer ou desfavorecer o efeito alelopático de um determinado composto.

Na tentativa de reduzir as interferências sobre o possível composto aleloquímico, é comum no estudo da alelopatia a utilização de extratos vegetais a partir da planta em estudo, sendo que neste caso a “extração” é compreendida como retirada seletiva e completa de substâncias ou frações ativas da droga vegetal de interesse, para isso utiliza-se de solventes tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (Mendez et al., 2011).

Trabalhando com extrato aquoso de trevo vesiculoso, Moraes et al. (2012), observaram que havia redução da germinação e alteração do desenvolvimento inicial de picão preto. Por sua vez, Tokura e Nóbrega (2005) observaram que os extratos das plantas de trigo, aveia preta, milheto, nabo forrageiro e colza apresentaram efeito alelopático em plântulas de milho. Spiassi et al. (2011), observaram que as coberturas

vegetais de canola e cártamo apresentaram efeito positivo sobre o crescimento inicial de plântulas de milho, já o crambe, nabo e aveia tiveram efeito negativo.

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos e obtidos de diferentes formas, sobre a germinação, desenvolvimento inicial de sementes e alterações bioquímicas nas plântulas de milho.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para a preparação dos extratos, espécies de trevo branco (*Trifolium repens* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratensis* L.) e trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) os quais foram cultivados em condições de campo, semeados em canteiros de 50m<sup>2</sup>. A densidade de semeadura utilizada foi de 5 kg ha<sup>-1</sup> de sementes. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico com terreno apresentando a declividade média em torno de 10%. Antes da semeadura, realizou-se o controle mecânico das plantas daninhas, e então realizou-se a semeadura a lanço seguido de incorporação das sementes ao solo com o auxílio de um rastel. Não foram realizadas adubações, irrigações e aplicação de defensivos durante o cultivo. Após 70 dias da semeadura, durante o estágio vegetativo, foi realizada a coleta da parte aérea das plantas de trevo para o preparo dos extratos.

A matéria fresca coletada foi encaminhada para o laboratório de sementes, onde foi desidratada em estufa com circulação de ar forçada, com temperatura de 40°C, evitando dessa forma a perda de possíveis compostos alelopáticos voláteis. Após a desidratação o material foi triturado em moinho de facas para diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área de contato do material vegetal e o solvente. Para tal, foi utilizado uma peneira em aço inox com malha de 20 mesh, o que equivale a uma granulometria de 0,840 mm.

Para obtenção do extrato por maceração, utilizou-se 50 g de pó de trevo que foi misturado a 450 mL de água fria destilada. Após agitação manual, foi mantido em repouso na ausência de luz por um período de 24 horas, posteriormente foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras, separando assim a parte sólida da solução.

Para o extrato obtido por infusão foi utilizado 450 mL de água destilada a qual foi previamente aquecida até a temperatura de 100 °C, em seguida adicionou-se 50 g de pó de trevo deixando-se em repouso por 20 minutos em recipiente fechado. Na sequência, foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras.

Para o extrato alcoólico, utilizou-se 50 g de pó de trevo imersos em 450 mL de álcool etílico 92,8%, mantidos em repouso por 24 horas na ausência de luz, à temperatura de 25 °C. Após este período, foi feita a filtração em papel filtro (porosidade de 3 micras), medindo-se o volume total da solução obtido após a filtração. Na sequência, se removeu o etanol presente na solução por meio de evaporador rotativo. Posteriormente o resíduo da evaporação foi dissolvido em água destilada até completar o volume inicial da solução obtida após a filtração.

Após os extratos serem preparados na concentração de 10% peso/volume, estes foram diluídos em água destilada até a obtenção das concentrações de 2,5%; 5% e 7,5%.

Foram utilizados grãos comerciais de milho híbrido AG 8025 para aplicação dos extratos. O teste empregado seguiu as Regras Oficiais para Análises de Sementes (RAS) de milho (Brasil, 2009). A germinação das sementes foi realizada em rolos de papel germitest sobre duas folhas de papel as quais foram umedecidas com os extratos ou água destilada, conforme os tratamentos. A quantidade de solução utilizada foi determinada multiplicando duas vezes e meia o peso do papel. Em cada rolo, foram dispostas 100 sementes de milho. O teste de germinação foi instalado em câmara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial (3x3x4+testemunha), constituído de: fator A - espécies de trevo (trevo branco, trevo vermelho e trevo vesículoso); fator B - formas de extrato (maceração, infusão e alcoólico); fator C - concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10% peso/volume) dos extratos vegetais e testemunha com aplicação de água destilada.

Diariamente, durante 10 dias, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962) e modificada por Wardle et al.,(1991),:  $VG=[N1/1+N2/2+N3/3+.....Nn/n]$ , onde, N1, N2, N3 e Nn são o número de sementes germinadas e 1, 2, 3 e n são o número de dias após semeadura. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram parte aérea e radícula com comprimento mínimo de 1 cm.

Ao final do período (10 dias), foram avaliadas a germinação, o comprimento radicular (CR) e da parte aérea (CPA), após secagem em estufa (85°C), foi determinada

a matéria seca do sistema radical (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA), pela medida de 20 plântulas por unidade experimental.

Para amparar os resultados obtidos, foi realizada uma avaliação dos compostos presentes nos extratos vegetais por meio de espectroscopia de infravermelho. Uma amostra dos extratos vegetais (os mesmos utilizados nos testes de sementes) foi coletada e liofilizada para retirada da água presente nas amostras. Do pó obtido após a liofilização, foi utilizado 1 mg da amostra dos extratos e adicionado 100 mg de KBr (brometo de potássio), os quais foram macerados e posteriormente prensados para a formação da pastilha. Depois da pastilha estar formada, esta foi inserida no espectrômetro de infravermelho e realizado a leitura. A região espectral utilizada foi de 250 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ .

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando houve significância estatística, foi procedido comparação entre médias, para os fatores espécies de trevo e tipo de extrato, utilizando-se o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o fator concentração dos extratos foi utilizada análise de regressão. Foi aplicado o teste de normalidade de Lilliefors, porém como os dados foram significativos, não houve necessidade de transformação dos dados. Foi utilizado o programa ASSISTAT para realização das análises estatísticas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os fatores estudados houve interação para as variáveis, germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA, AR, AST e proteína.

O trevo branco foi à espécie que mais afetou a germinação das sementes de milho. Em relação à forma de extração, o extrato por infusão foi o que menos interferiu na germinação.

O extrato alcóolico de trevo branco foi o que apresentou as menores porcentagens de germinação (reduziu em 76,7%), seguido do extrato alcóolico de trevo vesiculoso (reduziu em 61,8%). Para o trevo vermelho, o extrato que mais interferiu na germinação das sementes de milho foi a maceração (Tabela 1).

**Tabela 1.** Germinação (%) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	91 aA	91 aA	91 aA	91
Infusão	76 bB	82 bA	82 bA	80
Maceração	51 cB	53 cB	80 bA	61
Alcoólico	21 dC	78 bA	35 cB	45
Média	60	76	72	
CV	7,25			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

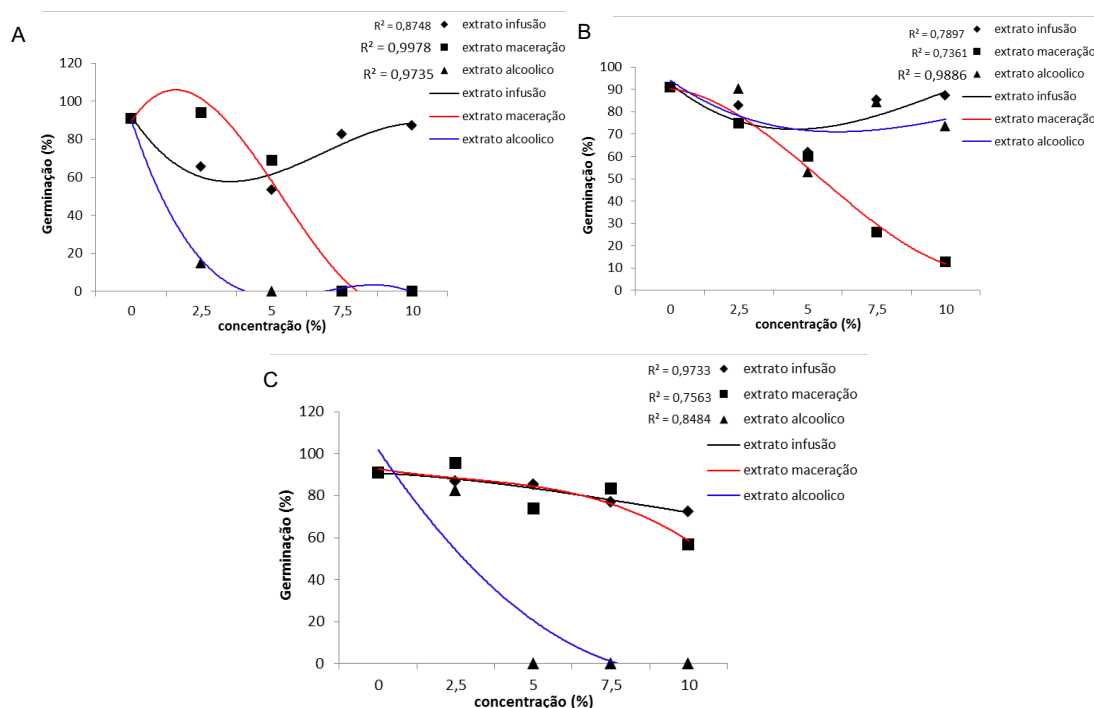
Ao comparar a utilização dos extratos com a testemunha é possível observar que de maneira geral, a aplicação dos extratos nas suas diferentes concentrações reduziu a germinação das sementes de milho (Figura 1).

Para a extração por maceração do trevo branco (Figura 1A), o aumento da concentração favoreceu a germinação das sementes de milho até 2,5%, a partir da qual reduziu, chegando à zero na concentração de 7,5%. Resultado semelhante foi observado por Araujo et al., (2011), onde aumento da concentração de extratos vegetais de *Crotalaria juncea* reduziu a germinação das sementes de milho, por outro lado Gomes et al., (2013), observaram que a aplicação de extrato aquoso de folhas frescas de tremoço azul (*Lupinus angustifolius* L.) não apresentou interferência sobre o processo germinativo de sementes de milho.

O nível de inibição proporcionado por determinado composto aleloquímico varia de acordo com a sua concentração, sendo que em baixas concentrações as substâncias alelopáticas podem não ser inibitórias para determinada espécie ou até mesmo apresentar efeito estimulante, por outro lado quando está em alta concentração as substâncias são completamente inibitórias (Santos et al., 2002), fato que foi observado nos extratos alcoólicos de trevo branco e vesiculososo, e maceração de trevo branco (figura 1A e 1C).

Em relação à concentração dos extratos de trevo vermelho, pode-se observar que para as diferentes formas de extração (Figura 1B), o aumento da concentração resultou em diminuição da germinação das sementes, porém o extrato infusão e alcoólico não apresentaram grandes reduções na germinação nas maiores concentrações quando comparado ao extrato por maceração. Na concentração de 10% a porcentagem de germinação foi próxima aos valores obtidos da testemunha. Resultado semelhante foi

encontrado por Santos et al. (2002), onde a aplicação de extrato de casca de café favoreceu a germinação das sementes de caruru nas maiores concentrações.



**Figura 1.** Germinação (%) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso).

São comuns os efeitos onde concentrações baixas favorecem a germinação, intermediárias inibem e altas concentrações favorecem o potencial germinativo (Souza et al., 2005). Segundo Gatti et al., (2004) os efeitos dos compostos alelopáticos se relacionam aos processos fisiológicos da planta receptora e de maneira geral, agem como inibidores da germinação e do crescimento, entretanto a maior parte que são inibitórios em alguma concentração, são também estimulantes quando presentes em menores ou maiores concentrações. Ou seja, a ação das substâncias aleloquímicas não é muito específica, podendo uma mesma substância desempenhar várias funções, dependendo de sua concentração e composição química presente no tipo de extrato utilizado (Cattelan et al., 2007).

Os resultados encontrados na germinação de sementes de milho são contrários à afirmação de Ferreira (2004). Segundo o autor, normalmente a porcentagem de germinação final é pouco afetada pela presença de compostos aleloquímicos, enquanto a

velocidade média de germinação é mais sensível, resultando em alterações no padrão de germinação.

Essa modificação no processo de germinação na presença de extratos vegetais normalmente é devido à presença de compostos fenólicos que causam inibição da síntese de ácido giberélico e ou atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, ao quais afetam a germinação das sementes, por interferirem no sistema enzimático hidrolítico e de mobilização de reservas da semente (Politycka e Gmerek, 2008).

Para o IVG, a extração alcoólica e a maceração resultaram em um maior atraso na germinação das sementes de milho, conseqüentemente com a redução mais expressiva do IVG. Em relação às espécies de trevo, o IVG apresentou os menores valores quando se utilizou extratos de trevo branco, com redução de 78,4% do IVG da cultura em comparação a testemunha (Tabela 2).

**Tabela 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	18,62 aA	18,62 aA	18,62 aA	18,62
Infusão	14,85 bC	16,44 bB	19,87 aA	14,05
Maceração	7,61 cB	7,68 dB	10,76 bA	8,69
Alcoólico	4,02 dC	10,86 cA	6,36 cB	7,09
Média	11,27	13,40	13,95	
CV	8,42			

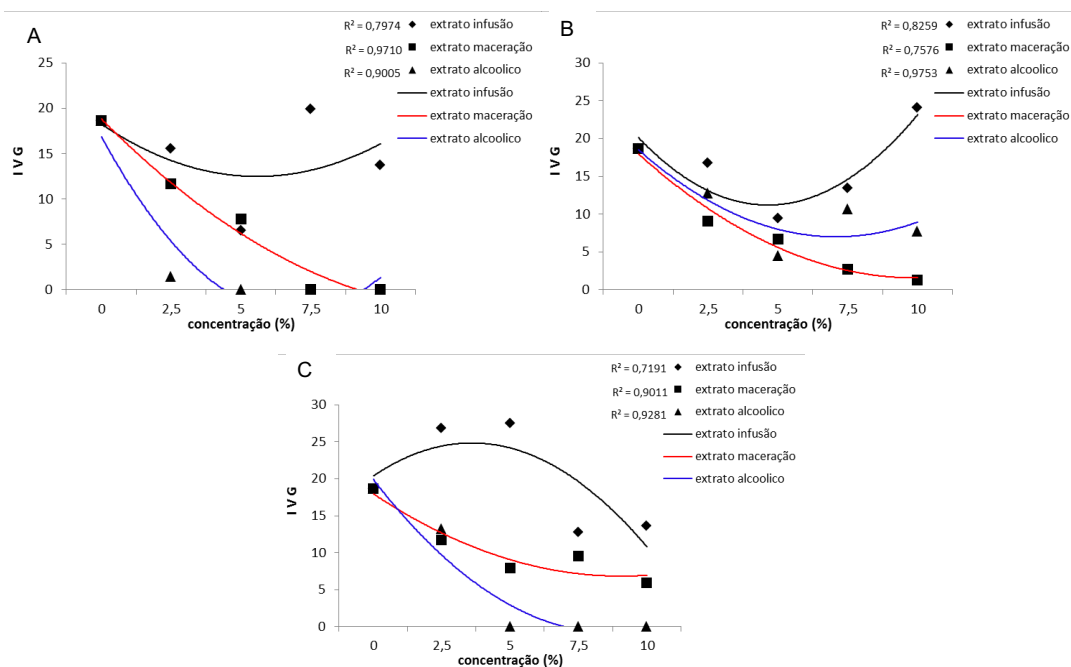
Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para os extratos alcóolico e maceração a elevação da concentração resultou na diminuição do IVG (Figura 2). Já para o extrato por infusão de trevo branco e vermelho a concentração intermediária foi mais expressiva na redução do IVG. Por outro lado, para o trevo vesiculososo ocorreu o inverso, a concentração intermediária do extrato por infusão aumentou o IVG, sendo estes valores maiores que a testemunha. Segundo Santos et al., (2002), substâncias consideradas inibitórias, possuem efeito estimulante sob baixas concentrações, com os inibidores parecendo agir sobre a atividade enzimática e ou atividade fisiológica da planta, estimulando a atividade do metabolismo.

A aplicação do extrato aquoso de Nim, sobre sementes de soja reduziu o IVG com o aumento da concentração do extrato, sendo este fator relatado como um problema, pois prejudica a colheita, por alterar a uniformidade na produção (Rickli et



al., 2011), fato este também observado por Sonego et al., (2012), aonde a aplicação de extratos de capim Tanzânia reduziu o IVG de sementes de milho.



**Figura 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso).

Essas alterações no processo de germinação da semente estão interligadas ao fluxo de água para o interior das células, que podem carregar consigo algumas substâncias alelopáticas podendo impedir ou retardar a divisão ou crescimento das células, resultando em um retardo da germinação (Ferreira e Áquila, 2000). Para a cultura, retardamento da germinação é um fator desfavorável, pois pode aumentar o período de interferência das plantas daninhas sobre a cultura, desuniformidade do stand de plantas, dentre outros fatores.

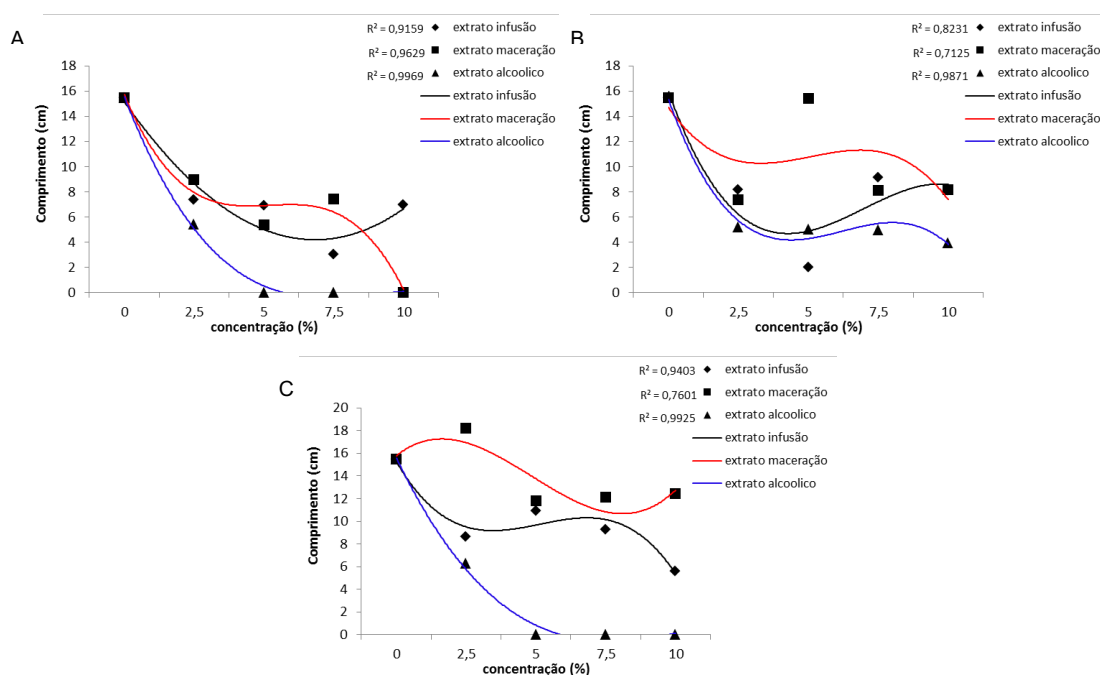
Como pode ser observado na Tabela 3, o extrato alcóolico foi o que mais afetou o crescimento de raízes de milho, reduzindo em média 66,66% esta variável quando comparado a testemunha. Em relação às espécies testadas, os extratos de trevo branco resultaram em redução média de 57,78% do crescimento do sistema radicular da cultura do milho nos diferentes extratos.

**Tabela 3.** Comprimento de raiz (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	Média
Testemunha	15,46 aA	15,46 aA	15,46 aA	15,46 a
Infusão	7,96 bC	8,57 cB	9,99 bA	8,84 c
Maceração	7,44 bC	10,89 bB	14,00 aA	10,78 b
Alcoólico	4,18 cB	6,93 dA	4,35 cB	5,15 d
Média	8,76 C	10,46 B	10,95 A	
CV	8,98			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figura 3, é possível observar que a aplicação dos extratos de trevo reduziu o comprimento médio da radícula quando comparado com a testemunha. Entre as formas de extração, os extratos alcoólico e infusão foram mais expressivos na redução do comprimento de raiz (CR).



**Figura 3.** Comprimento de raiz (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso).

Resultado semelhante foi encontrado por Rickli et al. (2011), aonde o aumento da concentração de extrato de Nim aplicado sobre as sementes de milho reduziu o comprimento médio de raiz.

Por outro lado Faria et al., (2009), observaram influência da aplicação de extrato aquoso de milho (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) e mucuna (*Stizolobium aterrimum*) sobre o comprimento médio de raiz e do hipocótilo de milho, os quais estimularam o comprimento médio das duas variáveis. De acordo com Maraschin-silva e Aquila (2006), a aplicação de extratos vegetais pode tanto inibir quanto estimular o crescimento de plântulas, devido a presença de aleloquímicos os quais causam modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, e na atividade fotossintética e respiratória, entre outras.

De acordo com Sousa e Bortolon (2002), a redução do crescimento radicular diminui a absorção de nutrientes e água, conseqüentemente reduz a fotossíntese, resultando na diminuição do comprimento da planta e redução da produção.

Na Tabela 4 é possível observar que o extrato alcoólico resultou nos menores valores de CPA, sendo que o extrato alcoólico de trevo vesiculoso causou uma redução de aproximadamente 68,1%, porém não diferiu do extrato alcoólico de trevo branco que reduziu 66,8%.

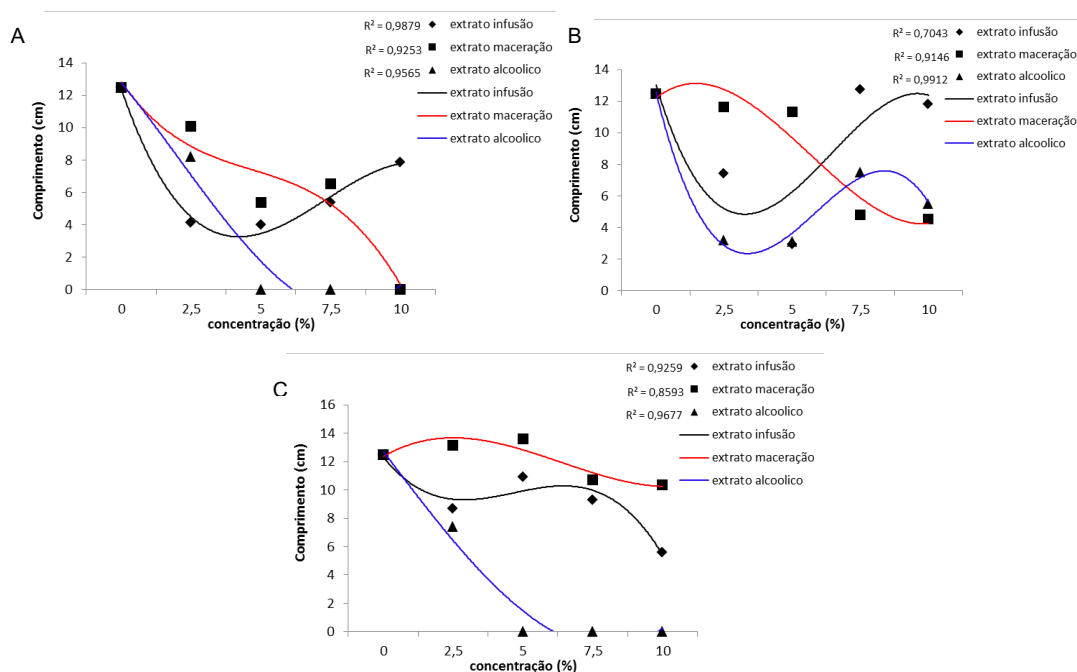
**Tabela 4.** Comprimento de parte aérea (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	12,47 aA	12,47 aA	12,47 aA	12,47
Infusão	6,77 bB	9,47 bA	9,39 bA	8,54
Maceração	6,89 bC	8,95 bB	12,05 aA	9,30
Alcoólico	4,14 cB	6,37 cA	3,98 cB	4,83
Média	7,56	9,31	9,47	
CV	9,47			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Analisando as Figuras 3 e 4, é possível observar que o comportamento do comprimento de raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CPA) em relação ao aumento da concentração dos extratos foi similar, porém as variações nos valores de CPA foram menos expressivas do que CR.

No extrato por maceração de trevo vermelho e vesiculoso houve um ligeiro estímulo ao CPA nas menores concentrações dos extratos. Gusman et al., (2008) observaram que o aumento da concentração do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* DC. reduziu o comprimento de parte aérea de plântulas de milho.



**Figura 4.** Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso).

No extrato por maceração de trevo vermelho e vesiculoso houve um ligeiro estímulo ao CPA nas menores concentrações dos extratos. Gusman et al., (2008) observaram que o aumento da concentração do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* DC. reduziu o comprimento de parte aérea de plântulas de milho.

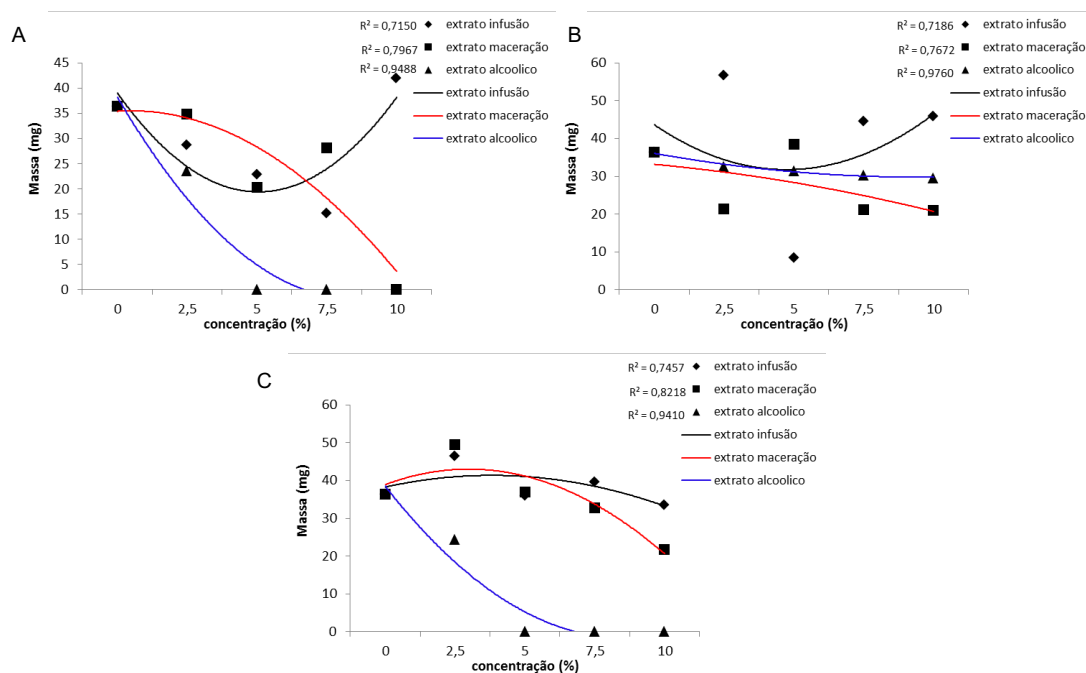
Na Tabela 5 é plausível afirmar que os extratos à partir de trevo branco foram mais expressivos na redução da MSR (redução média de 40,49%), sendo que entre eles o extrato alcoólico resultou em uma inibição de aproximadamente 67,05 %.

**Tabela 5.** Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	36,34 aA	36,34 aA	36,34 aA	36,34
Infusão	28,99 bB	38,40 aA	38,39 aA	35,26
Maceração	23,91 bB	27,63 bB	35,46 aA	29,00
Alcoólico	11,97 cB	32,04 abA	12,15 bB	18,72
Média	25,30	33,60	30,58	
CV	36,46			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figura 5 é possível observar que o aumento das concentrações dos extratos diminui a massa seca de raiz (MSR), exceto para os extratos infusão de trevo branco e vermelho, aonde na maior concentração do extrato houve pouca redução no teor de MSR quando comparado com a testemunha.



**Figura 5.** Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo).

Segundo Gusman et al., (2008), a alteração no desenvolvimento da radícula é um dos principais indicadores do efeito alelopático de extratos vegetais, sendo que esta normalmente é a mais afetada pelos aleloquímicos.

Para massa seca da parte aérea (MSPA) os extratos que causaram as maiores reduções foi o alcoólico de trevo vesiculososo e trevo branco, com uma redução de aproximadamente 70,2 % e 68,4 % respectivamente (Tabela 6).

Por outro lado, o extrato por infusão dos trevos branco e vermelho apresentou redução do comprimento e massa seca da parte aérea e do sistema radicular até a concentração de 5%, a partir da qual houve um aumento dose dependente (Figura 5 e 6). Resultado semelhante foi obtido por Santos et al. (2002), trabalhando com aplicação de extrato de casca de café sobre sementes de caruru. De acordo com o autor, o N presente na molécula de cafeína foi responsável pelo aumento do desenvolvimento da parte aérea

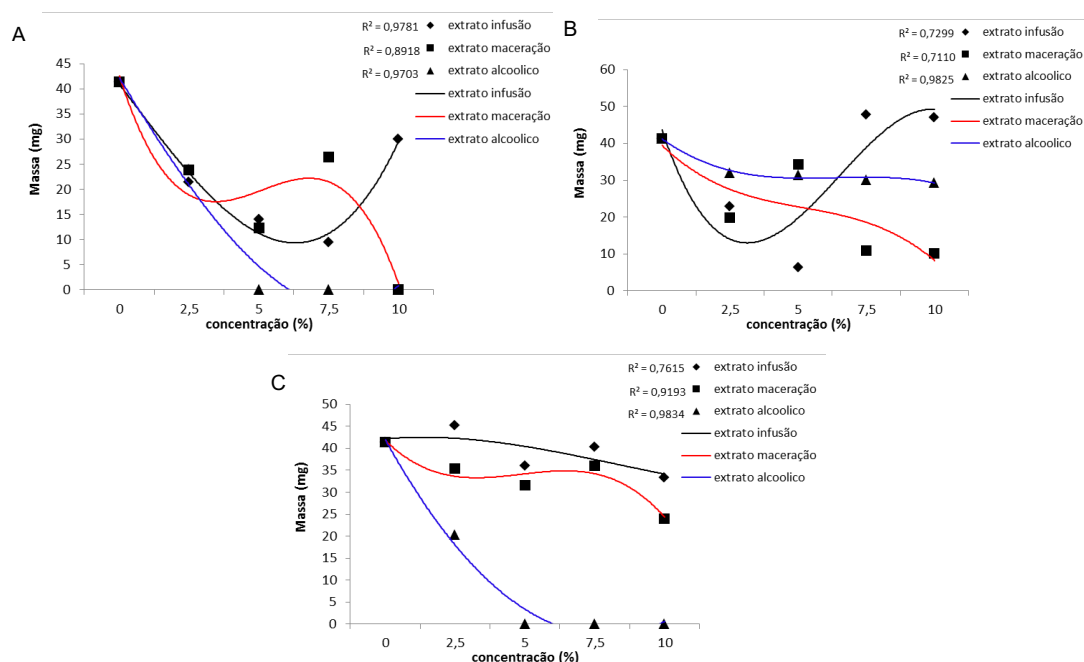
e sistema radicular, sendo este efeito mais expressivo do que o efeito de um possível aleloquímico presente no extrato de casca de café.

**Tabela 6.** Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	Média
Testemunha	41,38 aA	41,38 aA	41,38 aA	41,38
Infusão	23,24 bC	33,08 bB	39,25 aA	31,86
Maceração	20,76 bB	23,31 cB	33,62 bA	25,90
Alcólico	13,07 cB	32,89 bA	12,33 cB	19,43
Média	24,59	33,66	31,64	
CV	14,71			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Avaliando de maneira conjunta as Figuras 3, 4, 5 e 6, é possível observar que apesar de haver algumas oscilações entre as concentrações, no geral, o aumento da concentração dos extratos de trevo diminuiu o comprimento e massa seca tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas de milho.



**Figura 6.** Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo).

Segundo Ferreira e Áquila (2000), as modificações no padrão de desenvolvimento inicial e germinação podem ser resultados de inúmeros efeitos

primários, como por exemplo, modificação na permeabilidade da membrana, respiração, conformação de enzimas e seus receptores, transcrição e tradução do DNA e ou no comportamento de mensageiros secundários. Ou seja, as alterações observadas no crescimento de raiz e parte aérea, assim como a massa seca de raiz e parte aérea, podem ser resultado de alterações primárias no metabolismo da planta devido ao estresse causado por um composto ainda não identificado dos extratos de trevo.

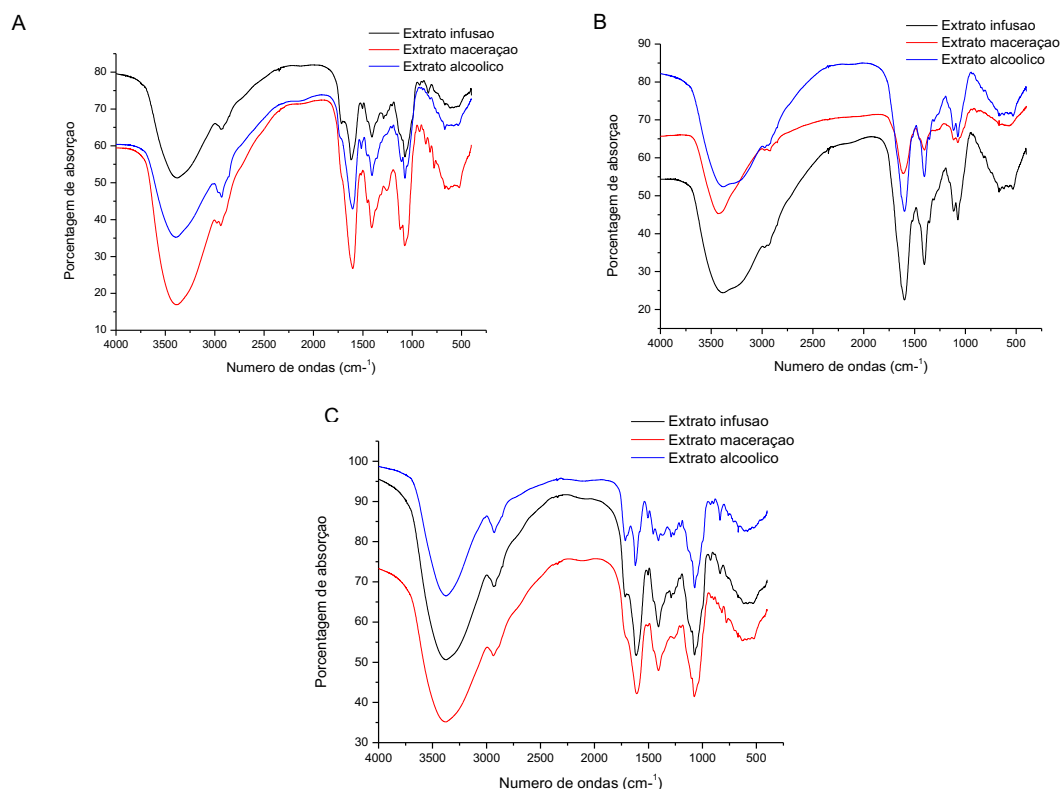
O extrato vegetal normalmente não apresenta efeito alelopático significativo sobre a germinação das sementes e sim sobre o desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea, já que estes parâmetros são mais sensíveis a presença de um aleloquímico no meio (Ferreira e Áquila, 2000). Porém os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os extratos de trevo apresentaram efeito tanto sobre a germinação das sementes quanto sobre o desenvolvimento do sistema radicular e aéreo, destacando desta forma o potencial de interferência dos extratos de trevo sobre as sementes e plântulas de milho.

À partir dos espectros de infravermelho, obtidos dos diferentes extratos (Figura 7), é possível observar que pela intensidade de absorção, o extrato alcoólico foi o que mais possibilitou uma maior concentração de compostos, exceto para o trevo branco, aonde a extração por infusão apresentou maior concentração de compostos que o alcoólico.

Em relação aos grupos funcionais, observou-se que em todos os extratos há a presença do grupo funcional álcoois e fenóis, com absorção característica de duas bandas, sendo uma banda larga de O-H na região de  $3.400-3.300\text{ cm}^{-1}$  e outra banda C-O na região de  $1.300-1.000\text{ cm}^{-1}$ , há também a presença de anel aromático com absorção característica na faixa de  $1.600-1.450\text{ cm}^{-1}$  (figura 7).

Com base nestes grupos funcionais é possível confirmar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos de trevo, pois estes são basicamente formados por um grupo hidroxila e um anel aromático, sendo estes os principais componentes de substâncias alelopáticas (Taiz e Zeiger, 2013).

Em relação aos processos de extração é possível observar que o extrato alcoólico foi mais eficiente na extração de compostos orgânicos da matéria seca de trevo, seguido do extrato por infusão e maceração respectivamente, exceto para a espécie de trevo branco, aonde a extração por infusão se sobressaiu aos demais processos de extração. Essa observação é baseada na quantidade de picos presentes no espectro.



**Figura 7.** Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (**A** – trevo branco, **B** – trevo vermelho, **C** – trevo vesiculoso).

Em relação às espécies de trevo, observou-se que para os extratos maceração e infusão, não houve diferença no espectro obtido a partir de trevo branco e vesiculoso, porém o espectro obtido a partir de trevo vermelho foi diferente em relação às outras espécies de trevo.

Por sua vez os espectros obtidos dos extratos alcoólicos foram diferentes entre as três espécies de trevo, demonstrado que etanol é mais eficiente na extração de compostos do que a água. Esse fato pode estar relacionado com a polaridade da molécula de etanol, a qual possui uma extremidade polar e outra apolar, diluindo assim tanto substâncias polares como apolares. Por sua vez, a molécula de água é considerada polar, ou seja, dilui apenas substâncias polares.

Segundo Taiz e Zeiger (2013) os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são solúveis em água e outros que são praticamente insolúveis.

Em relação aos métodos de infusão e maceração, pode-se dizer que a maior temperatura utilizada na infusão (100°C) tenha favorecido a diluição dos compostos na



água. Segundo Watanabe et al. (2006), as temperaturas mais altas frequentemente favorecem a solubilidade do soluto no solvente.

Dentre os compostos fenólicos que podem ser encontrados nos trevos, Taiz e Zeiger (2013) relatam a presença dos isoflavonóides, que possuem várias atividades biológicas destacando atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas), atividade estrogênica e propriedades inseticidas.

Correlacionado os resultados obtidos nos espectros dos extratos, com os dados do efeito dos mesmos sobre as sementes de milho é possível afirmar que os extratos alcoólicos dos trevos foram mais eficiente na redução da germinação e desenvolvimento inicial das sementes, por apresentar uma maior quantidade de compostos extraídos. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al., (2002), aonde o extrato alcoólico de jatobá do serrado apresentou maior efeito alelopático sobre sementes de alface que o extrato aquoso. Segundo este mesmo autor esse efeito provavelmente esteja relacionado à maior capacidade do solvente orgânico de retirar do material vegetal, maiores quantidades e ou substâncias inibidoras específicas.

Avaliando o efeito dos extratos, sob os caracteres agronômicos e bioquímicos, o extrato de trevo branco de maneira geral foi o que causou as maiores alterações negativas sobre as sementes de milho.

Isolando o efeito da forma de extração e avaliando apenas o efeito da espécie de trevo, é possível observar que nos extratos maceração e infusão de trevo branco e vermelho, houve as maiores supressões do desenvolvimento das sementes. Apesar de nestas formas de extração o espectro de trevo branco ser muito parecido com os obtidos em trevo vesiculoso, este último apresentou menor efeito que o trevo vermelho, que apresentou espectro diferente das outras duas espécies de trevo.

Para o extrato alcoólico os espectros obtidos das espécies de trevo foram diferentes entre si, porém o efeito sobre as sementes de milho foi semelhante entre o trevo branco e trevo vesiculoso, sendo estes os que causaram os maiores efeitos negativos sobre as sementes de milho. Por sua vez o extrato alcoólico de trevo vermelho apresentou menos interferência.

Apesar do processo de infusão ter extraído maior quantidade de compostos que a maceração, o efeito sobre as sementes foi oposto, ou seja, o extrato por maceração apresentou maior interferência sobre o desenvolvimento inicial de sementes de milho. Possivelmente esteja relacionado com a temperatura (100 °C) utilizada no processo de

infusão, que pode ter desativado ou desestruturado o aleloquímico, diminuindo seu efeito na supressão do desenvolvimento das sementes de milho.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de desenvolver estudos sobre a interação entre as plantas no sistema de rotação de culturas. Pois a interação entre elas pode não ter o efeito esperado, como por exemplo, a rotação de trevo com milho, que inicialmente seria vantajoso pelo fato de o trevo fixar nitrogênio, porém a liberação de aleloquímicos pode prejudicar o desenvolvimento inicial da cultura. Também há a necessidade de desenvolver estudos para avaliar se este mesmo efeito encontrado em laboratório ocorrerá no campo, considerando a presença de vários fatores ambientais interferindo sobre os aleloquímicos.

### CONCLUSÕES

Trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de milho, com destaque para o extrato alcoólico de trevo branco.

Os principais compostos identificados nos espectros dos extratos de trevo foram os compostos fenólicos, sendo estes sugeridos como responsáveis pelo efeito alelopático.

### REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.de.O; SANTANA, C.do.N; ESPÍRITO SANTO, C.L.do. Potencial alelopático de extratos vegetais de *Crotalaria juncea* sobre a germinação de milho e feijão **Rev. Bras. de Agroecologia**. v.6, n.1, p.108-116, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1º edição, p. 399, 2009.
- CATTELAN, L.V; STEIN, V.C; HEIDEN, G; BUTTOW, M.V; BOBROWSKI, V.L. Atividade alelopática de extratos aquosos de diferentes espécies de *Plantago* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 210-212, 2007.
- FARIA, T. M.; GOMES JUNIOR, F. G.; SÁ, M. E. DE; CASSIOLATO, A. M. R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1625-1633, 2009.
- FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia, In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, cap. 16, 2004.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopátia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasílica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GOMES, F.M; FORTES, A. M.T; SILVA, J; BONAMIGO, T; PINTO, T.T. Efeito alelopático da fitomassa de *Lupinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.8, n.1, p.48-56, 2013.

GUSMAN, G.S; BITTENCOURT, A.H.C; VESTENA, S. Alelopátia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Sci. Biol. Sci.** v. 30, n. 2, p. 119-125, 2008.

MARASCHIN-SILVA, F; AQUILA, M.E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta botânica Brasileira**, v.20, n.1, p. 61-69, 2006.

MENDEZ, A.S.L; SIMIONATO, N.O; VALDUGA, A.T; REGINATTO, F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Ciência Farmacológica Básica e Aplicada**, v.32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MORAES, P. V. D. DE; AGOSTINETTO, D; PANOZZO, L.E; GALON, L; OLIVEIRA, C; DAL MAGRO, T. Potencial alelopático de extratos aquosos de culturas de cobertura de solo na germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.4, p.1299-1314, 2012.

OLIVEIRA, N. S.; MERCADANTE, M.O; LOPES, P. S. N.; GOMES, I. A. C; GUSMÃO, E.; RIBEIRO, L. M. Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e etanólico de jatobá do cerrado. **Unimontes Científica**, v.4, n.2, p. 162-165, 2002.

PETRY, R.D; REGINATTO, F; DE-PARIS, F; GOSMANN, G; SALGUEIRO, J.B; QUEVEDO, J; KAPCZINSKI, F; GONZÁLEZ, G.O; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v.15, p.162-164, 2001.

POLITYCKA, B; GMEREK, J. Effect of ferulic and p-coumaric acidson the scitivity of hydrolytic enzymes and growth of radicals in germinating seeds of cucumber and pea. **Allelopathy Journal**. v.21, p.227-238, 2008.

RICKLI, H.C; FORTES, A.M.T; SILVA, P.S.S; PILATTI, D.M; HUTT, D.R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, milho, feijão e picão preto-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.473-484, 2011.

SANTOS, J.C.F; SOUZA, I.F.de; MENDES, A.N.G.M; MORAIS, A.R.de; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; MARINHO, J.T.S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v.37, n.6, p.783-790, 2002.

SONEGO, E.T; CUZZI, C; VILLANI, A; FREDDO, A.R; SANTOS, I.dos. Extratos alelopáticos de capim Tanzânia no desenvolvimento inicial de plântulas de milho. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.5, n.2, p. 61-72, 2012.

SOUSA, R.O.de; BORTOLON, L. Crescimento radicular e da parte aérea do arroz (*oryza sativa* L.) e absorção de nutrientes, em solução nutritiva com diferentes concentrações de ácido acético. **Revista brasileira de Agrociência**, v.8, n.3, p.231-235, 2002.

SOUZA, S.A.M.; CATTELAN, L.V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C.F.B.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA, B.H.G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, v.11, n. 3/4, p. 29-38, 2005.

SPIASSI, A; FORTES, A.M.T; PEREIRA, D.C; SENEM, J; TOMAZONI, D. Alelopatia de palhadas de coberturas de inverno sobre o crescimento inicial de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.577-582, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**; Tradução: DIVAN JUNIOR et al., 5o ed., Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.

TOKURA, L.K; NÓBREGA, L.H.P; Potencial alelopático de cultivos de cobertura vegetal no desenvolvimento de plântulas de milho. **Acta Scienc Agronomic**, v.27, n.2, p.287-292, 2005.

VERDI, L.G; BRIGHENTE, I.M.C; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quimica Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

WARDLE, A.D. AHMED, M.; NICHOLSON, K.S. Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants. **Journal Agriculture Research**, v.34, n.2, p.185-191, 1991.

WATANABE, C.B; NOSSE, T.M; GARCIA, C.A; PINHEIRO, N.P. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.8, n.4, p.76-86, 2006.

WEIR, T.L; PARK, S.W; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p. 472-479, 2004.