

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA TINTA DE NOZ

Os extratos aquosos do fruto verde ou drupa da noqueira, também designados por “tinta de noz”, foram obtidos aquando da colheita do fruto, em Setembro de 2011, numa exploração agrícola de nucicultura, na região do Sicó. Após a colheita, as drupas da noqueira foram colocadas numa tremonha de uma máquina (Figura 3), onde, com a ajuda de pequenas quantidades de água e movimentos rotativos da tremonha, se procedeu à separação entre o caroço e a casca verde. Os extratos aquosos obtidos após este processo foram levados para o laboratório e colocados em arca congeladora até à sua utilização neste estudo.



Figura 3. Processo de descasque da drupa da noqueira

Antes de se iniciarem os estudos para a determinação analítica da concentração da juglona nos extractos aquosos do fruto verde da noqueira, procedeu-se à sua descongelação seguida por filtração com bomba de vácuo. A determinação da juglona naqueles extratos aquosos foi efetuada pela técnica cromatográfica “high performance liquid chromatography” – Cromatografia Líquida de Alta Pressão – HPLC, e foi utilizado o método de quantificação por uso de um padrão externo.

Um dos principais constituintes da “tinta de noz” é uma quinona que tem o nome de juglona. A concentração da juglona na “tinta da noz” foi determinada por comparação com uma substancia padrão. Foram utilizadas amostras sintéticas de juglona e as amostras de tinta de noz obtidas para este efeito, conforme se descreveu. O sistema de HPLC utilizado é composto por uma bomba isocrática GBC, modelo LC1110; uma coluna cromatográfica do tipo 250mmx8mm, tamanho partícula=5 µm; um detetor Perkin Elmer, modelo LC-75, com detecção em ultravioleta a 280 nm. Os cromatogramas foram registados e integrados num integrador Hewlett Packad HP 3396 A. O modo de funcionamento do HPLC foi isocrático, com fluxo de 1ml/min. da fase móvel: Ácido acético 1%/Metanol na proporção de 30%.

2.2 ENSAIOS PARA ESTUDO DO EFEITO BIOCIDA DA JUGLONA PRESENTE NA TINTA DE NOZ

2.2.1 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal - Ensaios *in vitro*

Para estudo do efeito no crescimento das plantas da quantidade de tinta de noz presente, com e sem adição de adjuvante foram utilizadas culturas em crescimento *in vitro* de violeta (*Saintpaulia ionantha*) e de medronheiro (*Arbutus unedo*), disponibilizadas para este efeito.

Efetuaram-se três ensaios, que se diferenciaram nas culturas, quantidades do extrato de tinta de noz utilizado e presença de adjuvante.

No Ensaio 1, com 25 plantas de violeta, utilizaram-se as quantidades de 0; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0mL de extrato de tinta de noz, com 5 repetições por cada quantidade aplicada.

No Ensaio 2, utilizaram-se 20 plantas de violeta, com as quantidades de 0; 1,0; 2,0 e 3,0 mL de extrato de tinta de noz às quais se adicionou o adjuvante não iônico “Tween20”, para melhorar a aderência dos extratos à cutícula presente nas superfícies pilosas das folhas das violetas. Foram utilizadas 5 plantas por cada quantidade aplicada.

No Ensaio 3, utilizaram-se 6 plantas de medronheiro, com as quantidades de 0 e 4,0 mL de extrato de tinta de noz adicionadas de adjuvante “Tween20” com 3 repetições por cada quantidade aplicada.

Os três ensaios laboratoriais consistiram na esterilização inicial em autoclave, a 121°C durante 18 minutos, do frasco com a amostra de extrato de noz em estudo, que de seguida foi conservada no frigorífico, protegida com folha de alumínio, até à sua colocação nos tubos de ensaio com as plantas

O extrato de tinta de noz, assim como o adjuvante, foram adicionados aos tubos com as plantas em condições de assepsia, no interior de uma câmara de fluxo laminar horizontal.

Os tubos com as plantas em estudo foram colocados em câmara de crescimento nas seguintes condições: 16/8 h de fotoperíodo a uma temperatura de 25/20°C respetivamente e com uma intensidade média de luz de 96 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Procedeu-se ao registo fotográfico (Figura 4) dos tubos com as plantas em estudo, antes da adição do extrato de tinta de noz e 3 semanas após aquela aplicação.



Figura 4. Tubo de ensaio com planta de violeta (*Saintpaulia ionantha*)

2.2.2 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz na germinação de sementes - Ensaio *in vitro*

Neste ensaio utilizaram-se sementes de salsa (*Petroselinum crispum*), coentro (*Coriandrum sativum*), pastinaca (*Pastinaca sativa* L), onagra (*Oenothera biennis*), linho (*Linum usitatissimum*) e milhã (*Echinochloa*), colocadas a germinar em estufa de germinação de plantas a 23°C.

A germinação decorreu em placas de Petri com a humidade suficiente ao processo (20 mL de água destilada) e com 50 sementes de cada uma das plantas referidas. Foram testadas três quantidades de extrato de tinta de noz (0; 1,0 e 3,0 mL), num total de 18 placas de Petri.

Foi assegurada, durante o período em estudo, a humidade necessária para a germinação das sementes.

O extrato de tinta de noz foi adicionado, às placas de Petri com as sementes, em condições de assepsia, no interior de uma câmara de fluxo laminar horizontal.

Efetou-se a contagem de sementes germinadas aos 3 e 14 dias após o início do estudo (Figura 5). A mortalidade foi quantificada após 14 dias do início do estudo.

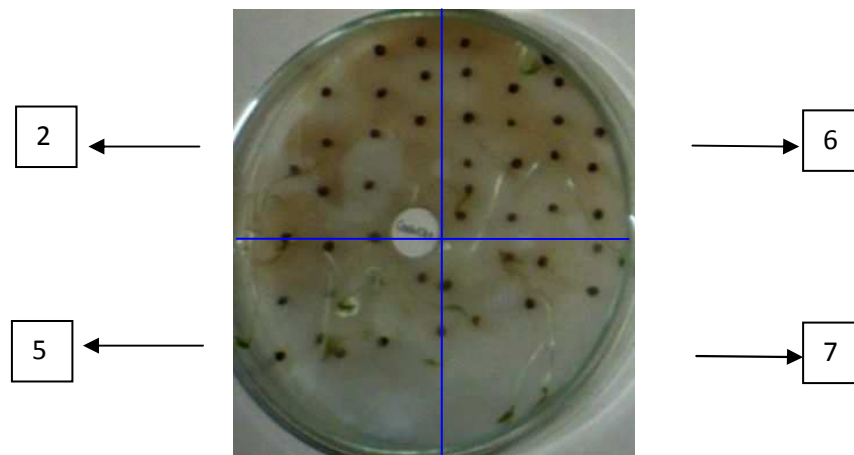


Figura 5. Metodologia utilizada para contagem do número de sementes germinadas.

2.2.3 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal - Ensaio de campo

Na parcela designada por Caldeirão, situada na exploração agrícola da Escola Superior Agrária de Coimbra, foi efetuado o estudo, através de dois ensaios, do efeito biocida do extrato de tinta de noz sobre uma infestante muito difícil de controlar e muito vulgar no local de estudo: a junça (*Cyperus rotundus*).

No primeiro ensaio (Ensaio 1) utilizaram-se 16 talhões com junça (Figuras 6 e 7), com dimensão de 0,5x0,5 m², aos quais se aplicou o extrato de tinta de noz, nas quantidades de 0; 10; 30 e 50 mL adicionadas à água destilada de forma a perfazer o volume de 750 mL, previamente determinado como o necessário para humedecer toda a área de cada talhão.



Figura 6. Ensaio1 com a junça (*Cyperus rotundus*) no campo do Caldeirão/ESAC

Efetuaram-se 4 repetições por cada dose utilizada. Foi feito o registo fotográfico antes e 3 dias após a aplicação do extrato de tinta de noz, para avaliação do efeito do tratamento.

		15	16		
	12	13	14		
	7	8	9	10	11
1	2	3	4	5	6
0ml 10ml 30ml 50ml					

Figura 7. Desenho experimental do Ensaio1 com a junça (*Cyperus rotundus*) no campo do Caldeirão/Esac.

Utilizou-se o registo e observação fotográfica como metodologia para atribuição de percentagem de necroses em cada talhão de junça. Dividiu-se a imagem do talhão em quatro partes, para facilitar a observação para, no final, atribuir um valor global e em percentagem, como se indica na Figura 8.



Figura 8. Método de observação fotográfica utilizado para atribuição de percentagem de área foliar necrosada.

No Ensaio 2, escolheram-se 20 plantas de junça, às quais se aplicou diretamente o extrato de tinta de noz, sem qualquer diluição, na quantidade necessária para assegurar o contacto do extrato com a parte aérea da planta. A localização das plantas estudadas encontra-se na Figura 9.

Foram efetuados registos fotográficos, antes e 3 dias depois da aplicação do extrato de tinta de noz, e no mesmo dia foram contabilizadas as necroses evidenciadas.

 V	 U			 J				 C
		 P	 M					
				 I		 E		 B
	 R	 O			 G			
	 Q		 L					
 X		 N		 H	 F	 D		 A

Figura 9. Desenho experimental do Ensaio 2 com a junça (*Cyperus rotundus*) no campo do Caldeirão/ESAC

Também neste ensaio foi utilizada a observação fotográfica para atribuição de percentagem de necrose em cada planta de junça. No registo fotográfico realçou-se a planta, para facilitar a observação e atribuir um valor percentual, conforme se indica na Figura 10.



Figura 10. Observação da planta para atribuição de um valor percentual de área foliar necrosada.

2.3 TRATAMENTO DE DADOS

O tratamento estatístico dos resultados para análise e estudo dos tratamentos (análise de variância, médias e desvios padrão e testes de comparação entre médias) foi efetuado com o programa Statistica, versão 6-0, de 1997, com a metodologia ANOVA.

Nos casos em que existiram diferenças significativas, foi utilizado o teste de Duncan (nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para identificar as diferenças entre os tratamentos.

Previamente ao tratamento estatístico, procedeu-se à transformação angular dos dados percentuais de acordo com: $\text{ângulo} = \text{arc sen} (\text{proporção})^{1/2}$, de forma a garantir uma distribuição normal das variáveis (Zar 1996).