

Prospecção fitoquímica, teor de bixina e atividade alelopática de extratos de *Bixa orellana* L.

Rafaela de Souza Santos¹, Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho², Hellen Regina Fernandes Batista-Ventura², Carlos Frederico de Souza Castro² & Matheus Vinícius Abadia Ventura^{1,2}

¹ Centro Universitário do Sudoeste Goiano, UniBRAS, Rio Verde, Goiás, Brasil

² Instituto Federal Goiano, Rio Verde, Goiás, Brasil

Correspondência: Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho, Laboratórios de Química Tecnológica e de Hidráulica e Irrigação, Instituto Federal Goiano, Rio Verde, Goiás, Brasil. E-mail: astronomoamadorgoias@gmail.com

Recebido: Novembro 03, 2022

Aceito: Dezembro 10, 2022

Publicado: Dezembro 12, 2022

Resumo

Sementes de *Bixa orellana* possuem alto teor de bixina em uma fina camada externa. Sabe-se que alguns carotenoides apresentam ação alelopática em sementes de vegetais. Este estudo teve por objetivo realizar através da prospecção fitoquímica qualitativa, determinar o teor de bixina quantitativamente e avaliar a partir dos extratos aquoso e etanólico 95% das sementes trituradas de *B. orellana* sobre o efeito alelopático sobre duas sementes de grandes culturas. Sementes de *B. orellana* foram trituradas e os extratos produzidos. A prospecção fitoquímica foi realizada qualitativamente onde resultados positivos foram determinados pela alteração de coloração e formação de corpo de fundo em diferentes reagentes. O teor de bixina foi determinado por espectroscopia no ultravioleta e expressa em percentagem. A atividade alelopática foi determinada em diferentes concentrações de extrato aquoso e etanólico 95% sobre sementes de *Glycine max* e *Zea mays*. Foram obtidos resultados positivos para diversos grupos fitoquímicos como flavonoides, taninos, açúcares, carotenoides, compostos alifáticos e cumarinas, o teor de bixina foi de 1,32% e 3,68% em ambos os extratos produzidos a partir das sementes de urucum (aquoso e etanólico 95%), respectivamente. O extrato aquoso demonstrou ser não significativo sobre a taxa de germinação em *G. max* e *Z. mays*, embora tenha demonstrado influenciar no tamanho radicular em ambas as espécies. Já o extrato etanólico 95%, demonstrou ser altamente eficaz sobre a atividade alelopática tanto para o índice de germinação quanto para desenvolvimento radicular nas espécies alvo. Os extratos aquosos e etanólico 95% de *Bixa orellana* apresentaram riqueza de fitocompostos extraíveis, no teor de bixina e com eficácia sobre a atividade alelopática.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Zea mays*, carotenoides, taninos, fitosteróis.

Abstract

Bixa orellana seeds have a high bixin content in a thin outer layer. It is known that some carotenoids have an allelopathic action on seeds of vegetables. The objective of this study was to carry out, through qualitative phytochemical prospecting, to determine the bixin content quantitatively and to evaluate, from the aqueous and 95% ethanolic extracts of crushed *B. orellana* seeds, the allelopathic effect on two seeds of large cultures. *B. orellana* seeds were crushed and the extracts produced. Phytochemical prospecting was performed qualitatively where positive results were determined by color change and background body formation in different reagents. The bixin content was determined by ultraviolet spectroscopy and expressed as a percentage. The allelopathic activity was determined at different concentrations of 95% aqueous and ethanolic extract on *Glycine max* and *Zea mays* seeds. Positive results were obtained for several phytochemical groups such as flavonoids, tannins, sugars, carotenoids, aliphatic compounds and coumarins, the bixin content was 1.32% and 3.68% in both extracts produced from annatto seeds (aqueous and ethanolic 95%), respectively. The aqueous extract proved to be non-significant on the germination rate in *G. max* and *Z. mays*, although it was shown to influence root size in both species. The 95% ethanolic extract, on the other hand, proved to be highly effective on allelopathic activity for both the germination index and root development in the target species. The aqueous and 95% ethanolic extracts of *Bixa orellana* showed richness of extractable phytochemicals, in bixin content and with efficacy on allelopathic activity.

Keywords: *Glycine max*, *Zea mays*, carotenoids, tannins, phytosterols.

Resumen

Las semillas de *Bixa orellana* tienen un alto contenido de bixina en una fina capa exterior. Se sabe que algunos carotenoides tienen una acción alelopática sobre las semillas de las plantas. El objetivo de este estudio fue realizar una prospección fitoquímica cualitativa, determinar cuantitativamente el contenido de bixina y evaluar el efecto alelopático en dos semillas de grandes cultivos a partir de extractos acuosos y etanólicos 95% de semillas trituradas de *B. orellana*. Se trituraron semillas de *B. orellana* y se produjeron los extractos. Se realizó prospección fitoquímica de forma cualitativa donde se determinaron resultados positivos por cambio de color y formación de cuerpos de fondo en diferentes reactivos. El contenido de bixina se determinó por espectroscopia ultravioleta y se expresó en porcentaje. La actividad alelopática se determinó a diferentes concentraciones de extracto acuoso y etanólico 95% sobre semillas de *Glycine max* y *Zea mays*. Se obtuvieron resultados positivos para varios grupos fitoquímicos como flavonoides, taninos, azúcares, carotenoides, compuestos alifáticos y cumarinas, el contenido de bixina fue de 1,32% y 3,68% en ambos extractos elaborados a partir de semillas de achiote (acuoso y etanólico 95%), respectivamente. El extracto acuoso resultó no ser significativo sobre la tasa de germinación en *G. max* y *Z. mays*, aunque sí mostró influencia en el tamaño de la raíz en ambas especies. El extracto etanólico al 95%, por otro lado, demostró ser altamente efectivo en la actividad alelopática tanto para el índice de germinación como para el desarrollo de raíces en las especies objetivo. Los extractos acuoso y etanólico 95% de *Bixa orellana* mostraron una riqueza de fitocompuestos extraíbles, en el contenido de bixina y con eficacia sobre la actividad alelopática.

Palabras clave: *Glycine max*, *Zea mays*, carotenoides, taninos, fitoesteroles.

1. Introdução

A influência química que uma planta pode causar a outra, de forma benéfica ou maléfica, é conhecida pelo ser humano desde a antiguidade. A alelopatia como é conhecida atualmente, foi proposta por Molish em 1937, onde o pesquisador descrevia os efeitos ocasionados por substâncias químicas (aleloquímicos), produzidos por um determinado vegetal, e estes eram disseminados para o ambiente de diferentes formas (Silva et al., 2018).

Os compostos alelopáticos ao longo da história foram muitas das vezes utilizados como uma opção de substituição aos agroquímicos sintéticos com capacidade de supressão no crescimento de plantas daninhas, uma vez que, os aleloquímicos podem oferecer benefícios sobre uma série de ocorrências em plantas de interesse agrícola e econômico (Gindri; Coelho, 2020).

Diversas fitomoléculas são produzidas em diferentes órgãos do vegetal, como raízes, folhas, flores, caule, frutos e sementes, e sua concentração nos tecidos depende de diversos fatores bióticos e abióticos, como temperatura, pluviosidade, luminosidade (radiação), herbivoria, fitopatógenos entre outros (Soares; Machado, 2007). A liberação dos aleloquímicos no meio ambiente se dá por diferentes formas (volatilização, exsudação radicular, lixiviação e decomposição de resíduos), e uma das principais metas nos estudos de alelopatia é encontrar compostos bioativos como potencial fonte de biomoléculas orgânicas de ação herbicida, devido aos crescentes casos de espécies invasoras resistentes aos sítios de ação dos herbicidas comerciais convencionais (Albuquerque et al., 2016).

Na agricultura, os efeitos alelopáticos possuem várias utilizações como: na contribuição pela busca por defensivos agrícolas naturais de baixa toxicidade; na compreensão do antagonismo de cultivo consorciado ou sucessivo; na diminuição sobre o uso de herbicidas a partir de moléculas sintéticas, substituindo-os por processos alelopáticos; manejo e controle das ervas daninhas por meio de rotação de culturas; sistemas adequados de semeadura entre espécies vegetais, sistemas agroecológicos sobre o controle de pragas; uso de coberturas mortas; plantas companheiras, e na introdução voluntária de espécies selvagens (Silva; Saraiva, 2018; Pereira et al., 2018; Shah et al., 2018; Hussain et al., 2021).

As interações alelopáticas ocorrem através de grupos de fitomoléculas do metabolismo especial que são liberadas no ambiente por vegetais ou microrganismos que podem apresentar sinergismo positivo ou negativo sobre o crescimento e desenvolvimento em sistemas biológicos, ocasionando assim, efeitos diretos ou indiretos, benéficos ou deletérios a diversos vegetais, entre outras formas biológicas (Prinsloo; Plooy, 2018; Ajay et al., 2019). É um importante mecanismo ecológico que influencia a dominância e sucessão das plantas, cujas interações são responsáveis pelo estabelecimento e sobrevivência de espécies no ambiente (Silva et al., 2018).

Os aleloquímicos podem oferecer novas e excelentes oportunidades hoje, estabelecidas para a “cultura e/ou produção verde”, na diversificação sobre o controle de plantas invasoras nas culturas de interesse, reduzindo ou eliminando os resíduos que herbicidas sintéticos deixados no ambiente por períodos variáveis, preservando assim, os recursos naturais e garantindo produtos agrícolas com alta qualidade, desprovidos de resíduos contaminantes e tóxicos para humanos e animais (Gusman et al., 2017).

Entre as diversas espécies vegetais onde extratos são produzidos por diferentes solventes extratores e testados sobre a atividade alelopática, podemos citar o urucuzeiro (*Bixa orellana*) que é uma planta arbórea, com altura variando entre 2-9 m, frutífera, onde as sementes apresentam coloração avermelhada devido a presença de flavonoides bixina e norbixina. A espécie pertencente à família Bixaceae e gênero *Bixa*, apresentando ampla distribuição geográfica que vai da América Central até a América do Sul, principalmente na região amazônica brasileira (Silva et al., 2018; Silva et al., 2019).

Os frutos do urucuzeiro apresentam-se em cápsulas dispostas em panículas, com presença de espinhos flexíveis revestindo a casca do fruto de coloração variando entre vermelho, verde a laranja conforme cultivar (Pech Hoil et al., 2017).

No interior dos frutos encontram-se entre 30 e 50 sementes de pequeno tamanho, e estas são revestidas pelo arilo, com uma finíssima película contendo carotenóides que apresentam coloração fortemente avermelhada, onde sua principal aplicação comercial está em indústrias alimentícias, farmacêuticas e têxteis (Mantovani et al., 2013). As sementes são compostas de celulose (40 a 45%), açúcares (3,5 a 5,2%), óleos essenciais (0,3 a 0,9%), proteínas (13 a 16%) e pigmentos alfa e beta carotenos (4,5 a 5,5%) (Barrozo et al., 2013).

O carotenoide bixina citada anteriormente, corresponde a cerca de 80% dos pigmentos do grupo dos carotenoides, compondo cerca de 2,5% da massa seca da semente de *B. orellana*. A bixina é um apocarotenoide originado da clivagem dos carotenos, por meio de enzimas específicas. A retirada do grupo metil éster presente na molécula de bixina origina a norbixina (Garcia et al., 2015).

Nesse sentido, a busca por biomoléculas para a agricultura verde, se torna de grande e pontual importância, onde é possível verificar através de diferentes solventes extratores, a possibilidade de se obter fitomoléculas capazes de agirem com efeito alelopático. E com isso, o uso das sementes de *B. orellana* como demonstra em estudos, apresentam uma gama quantidade de fitomoléculas (flavonoides, alcaloides, terpenos, fenólicos: ácido gálico e ácido alifático, diterpenos, óleo essencial, pirogalol, saponinas, açúcares redutores e óleo fixo) (Sanchez et al., 2017; Silva et al., 2018; Carvalho et al., 2022), com intuito promotor dessa ação sobre uma diversidade de sementes para que possamos verificar tal efeito biológico.

O estudo teve por objetivo realizar a prospecção fitoquímica, determinar o conteúdo de bixina e avaliar o efeito biológico alelopático do extrato aquoso e etanólico 95% das sementes de *Bixa orellana* sobre sementes de milho (*Zea mays*) variedade AG 5055 PRO e soja (*Glycine max* (L.) Merr.) variedade BRS 523 como espécies vegetais alvos.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes e equipamentos

Ácido sulfúrico P.A. – ACS (Alphatec, Brasil), ácido clorídrico P.A. – ACS (Neon, Brasil), acetato de chumbo II P.A. – ACS (Êxodo, Brasil), ácido (3,5)-dinitrosalisílico P.A. – ACS (Inlab, Brasil), ácido 3,5-dinitrobenzóico P.A. – ACS (Neon, Brasil), carbonato de cálcio P.A. – ACS (Neon, Brasil), cloreto de ferro II (Alphatec, Brasil), Etanol 95% P.A. – ACS (Dinâmica, Brasil), ferrocianeto de potássio P.A. – ACS (Vetec, Brasil), hidróxido de sódio P.A. – ACS (Alphatec, Brasil), iodeto de potássio P.A. – ACS (Neon, Brasil), iodo sublimado P.A. – ACS (Alphatec, Brasil), sulfato de cobre II P.A. – ACS (Dinâmica, Brasil), tartarato de sódio e potássio P.A. – ACS (Neon, Brasil) e vanilina P.A. – ACS (Dinâmica, Brasil). Câmara de germinação do tipo B.O.D. (Tecnal, Mod. TE-371, Brasil), espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, Mod. M-51, Itália) e pHmetro digital (Lucadena, Mod. Luca-210P, Brasil).

2.2. Coleta e identificação da espécie

Sementes de *B. orellana* (200 g) foram coletadas em indivíduos localizados em área urbana no município de Rio Verde, Goiás, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas (17°47'59.6"S e 50°54'42.3"W). A espécie foi identificada pelo segundo autor, e uma exsicata foi herborizada e depositada no Herbário do Laboratório de Sistemática Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Biologia e Conservação do Instituto Federal Goiano, Rio

Verde, Goiás, Brasil, com o Voucher (HRV: 10.009). Não foi determinando o tipo de cultivar de *B. orellana*.

2.3. Espécies alvos

Como espécies alvo no ensaio de alelopatia, foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) variedade AG 5055 PRO e soja (*Glycine max* (L.) Merr.) variedade BRS 523.

2.3. Produção dos extratos

Alíquotas contendo 10 g de sementes de *B. orellana* foram trituradas em almofariz e pistilo. Após obtenção de um pó fino e homogêneo, esse, foi transferido para *Erlenmeyers* com capacidade para 250 mL. Para o extrato aquoso, foi adicionado 100 mL de água destilada e esterilizada, e para o extrato etanólico, álcool etílico 95%. Ambas as amostras tiveram o pH ajustado para 7,2. Em seguida, os extratos foram lacrados e transferidos para D.B.O. com temperatura controlada em $5 \pm 2,0$ °C sem fotoperíodo por 72 h. Após esse período, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo faixa azul, e o sobrenadante coletado. Esse foi considerado como extrato bruto, onde foram geradas as seguintes diluições (concentrações em %) conc. 2, 5, 7 e 10% (v/v).

Para o extrato etanólico 95%, um passo adicional foi realizado. Após a obtenção do extrato bruto, o mesmo foi transferido para dessecadora contendo sílica gel acoplada a uma bomba de vácuo, para redução e extração do solvente. Após esse procedimento, foram produzidas as diluições citadas anteriormente.

2.4. Prospecção fitoquímica

O ensaio de prospecção fitoquímica qualitativa, foi realizado para os seguintes grupos do metabolismo especial: saponinas, açúcares redutores e não redutores, aldeídos e cetonas, ácidos orgânicos, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, fenóis, taninos, flavonoides, alcaloides, purinas, cumarinas, glicosídeos cardíacos, catequinas, sesquiterpenolactonas, esteroides e triterpenóides, oxalatos, azulenos, depsídeos e depsidonas, antraquinonas, duplas olefinas, flobataninos, emodina, óleo essencial, resinas, ácidos graxos e xantoproteínas conforme descrito por Sonam et al. (2017).

2.5. Determinação do teor de bixina

A determinação do teor de bixina seguiu conforme descrito por Moreira et al. (2014) adaptado. Alíquotas contendo 25 g de sementes previamente trituradas, foram misturadas aos solventes água e etanol 95%, separadamente. Após a adição dos solventes, as misturas foram mantidas em D.B.O. sem fotoperíodo a $5 \pm 2,0$ °C sob agitação constante a 170 rpm por 48 h. Ao término da extração, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo faixa azul. A eficiência de extração pelos solventes sobre o teor de bixina, foi avaliado utilizando-se espectroscopia no UV-Vis no comprimento de ondas 470 nm no modo absorvância (Abs) e célula (cubeta de vidro quartzo) com 1 cm de percurso óptico. Como branco foi utilizado as soluções extratoras.

Para a obtenção do teor de norbixina foi empregada a Lei de Lambert-Beer, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3.473$ (Yabiku; Takahashi, 1992; Silva et al., 2010). A % de norbixina encontrada foi multiplicada pelo fator $f = 1,037$ dá a % de bixina. Os resultados foram expressos em (%) percentagem de extração.

2.6. Ensaio alelopático

O número de sementes germinadas foi contabilizado por percentagem de germinação (PG), o índice de velocidade de germinação (IVG) ao final de sete dias, como descrito por Espinosa et al. (2019). A PG foi obtida pela representação da % de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinação sob a condição experimental. O IVG foi obtido pela somatória dos números de sementes germinadas por dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação.

2.7. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira et al., 2019) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

3. Resultados

Em ambos os extratos aquoso e etanólico, foram observados diversos grupos fitoquímicos com resultados positivos que são de grande importância na fitomedicina como: saponinas, açúcares, ácidos orgânicos, fenóis, taninos hidrolizáveis, flavonoides, alcaloides, carotenoides, compostos alifáticos, cumarinas, esteróides e triterpenóides e fitosteróis (Tabela 1).

Tabela 1. Prospecção fitoquímica dos extratos, aquoso (EXUA) e etanólico 95% (EXUE) a partir das sementes de *Bixa orellana*.

*Fitoquímica	EXUA	EXUE 95%
Saponinas espumílica	+	+
Saponinas hemolítica	+	+
Açúcares redutores	+	+
Açúcares não-redutores	+	+
Ácidos orgânicos	+	+
Polissacarídeos	-	-
Proteínas e aminoácidos	-	+
Fenóis	+	+
Taninos	Az	Az
Flavonoides	+	+
Alcaloides	+	+
Purinas	-	-
Cumarinas	+	+
Glicosídeos cardíacos	-	-
Catequinas	-	-
Carotenoides	+	+
Sesquiterpenolactonas	-	-
Esteróides e triterpenoides	+	+
Oxalatos	-	-
Azulenos	-	-
Depsídeos e depsidonas	-	-
Antraquinonas	-	+
Compostos aromáticos ou alifáticos	Am	Am
Óleo essencial	-	-
Resinas	-	-
Ácidos graxos	-	-
Carboidratos	-	-
Flobataninos	-	+
Fitoesteróis	+	+
Diterpenos	-	-
Quinonas	-	-
Emodinas	-	-

Nota: Taninos (Azul): hidrolizáveis. Compostos aromáticos ou alifáticos (Amarelo): alifático. *Resultados obtidos a partir de duas réplicas.

Os teores de bixina das sementes esgotadas de urucum após extração com água e etanol 95%, foram de $1,32\% \pm 0,26$ b e $3,68\% \pm 0,13$ a, respectivamente.

A testemunha apresentou taxa de 19 sementes germinadas no segundo dia de ensaio com comprimento médio de radícula de 27 mm para as repetições. Para os tratamentos, não foi observado diferença significativa entre as concentrações 5 a 10% sobre a taxa de germinação avaliando o extrato aquoso das sementes de *B. orellana*. Embora, o extrato etanólico 95%, demonstrou diferença significativa entre as três concentrações, sendo a conc. 10% com a mais baixa taxa de germinação. Quando comparado o comprimento radicular a concentração de extrato aquoso, observa-se que, o maior comprimento de raízes foi relatado na menor concentração. O extrato aquoso das sementes de *B. orellana* conc. 7 e 10% apresentaram alto efeito alelopático. Entre as conc. 5 e 7% para o extrato etanólico 95%, não foi observado diferença estatística para o comprimento de raízes. Novamente, a maior conc. 10%, demonstrou forte inibição sobre o desenvolvimento radicular das sementes de *Z. mays* (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de germinação e comprimento de radícula em milho variedade AG 5055 sobre diferentes concentrações de extratos aquoso e etanólico 95% das sementes de *Bixa orellana*.

Tratamento	Germinação	Comprimento
Milho	(%)	radícula
		(mm)
Ger 2º Dia	19,20	27,60
EXUA		
Tratamentos	Germinação	Comprimento
concentrações	(%)	radícula
		(mm)
5%	17,00 ^{ns}	21,78 a
7%	16,80 ^{ns}	15,77 b
10%	17,00 ^{ns}	12,68 c
CV (%)	12,62	9,92
EXUE 95%		
Tratamentos	Germinação	Comprimento
concentrações	(%)	radícula
		(mm)
5%	18,20 a	13,26 a
7%	16,00 b	12,65 a
10%	3,80 c	5,75 b
CV (%)	10,09	12,69

Nota: EXUA: Extrato sementes urucum aquoso. EXUE: Extrato sementes urucum etanólico. ns: não significativo. Médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

A taxa de germinação da testemunha foi de 19 germinações no primeiro dia de ensaio, com radícula média de 16 mm para a variedade de soja ensaiada entre as repetições. Novamente, a taxa de germinação entre as conc. 5-10% para o extrato aquoso das sementes de *B. orellana*, não apresentaram diferença significativa. Para o comprimento da radícula, observou-se que o extrato aquoso conc. 10%, apresentou o menor comprimento com média de 9 mm. A menor taxa de germinação foi observada para o extrato conc. 10% etanólico 95%, com 3% de germinação. Em complemento, essa concentração afetou fortemente o desenvolvimento radicular com média de 9 mm. Já as conc. 5 e 7% não apresentaram diferença significativa para sementes de *Glycine max* (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de germinação e comprimento de radícula em soja variedade BRS 523 sobre diferentes concentrações de extratos aquoso e etanólico 95% das sementes de *Bixa orellana*.

Tratamentos Soja	Germinação (%)	Comprimento radícula (mm)
Ger 1º Dia	19,80	16,89
EXUA		
Tratamentos concentrações	Germinação (%)	Comprimento radícula (mm)
5%	18,60 ^{ns}	17,60 a
7%	17,40 ^{ns}	15,85 a
10%	17,00 ^{ns}	9,95 b
CV (%)	6,20	12,29
EXUE 95%		
Tratamentos concentrações	Germinação (%)	Comprimento radícula (mm)
5%	18,20 a	12,36 a
7%	16,00 b	12,65 a
10%	3,80 c	5,75 b
CV (%)	10,09	12,69

Nota: EXUA: Extrato sementes urucum aquoso. EXUE: Extrato sementes urucum etanólico. Médias significativas foram comparadas pelo teste de *Tukey* com 5% de significância.

4. Discussão

Os metabólitos especiais são formados a partir de vias de biossíntese que derivam do metabolismo primário do Carbono, via os intermediários principais, ácido chiquímico e o acetato, e alguns grupos fitoquímicos são formados a partir da combinação entre uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados desses (Garcia; Carril, 2009; Rockenbach et al., 2018).

Em nossos achados, foram verificados a presença de fenóis e taninos em ambos os extratos das sementes de *B. orellana*. Braga et al. (2007) corroborando com nossos resultados obtidos, encontraram a presença de triterpenóides, esteroides, alcaloides, compostos lactônicos, taninos e flavonoides no extrato metanólico das sementes de urucum colhidas no Brasil. Silva et al. (2010) e Valdés et al. (2011) complementam que, esses grupos do metabolismo especial dos vegetais, apresentam uma importante atividade biológica no combate e tratamento de pacientes portadores de malária (*Plasmodium* sp.) que atingem países das Américas Central e do Sul, Continente Africano e Asiático, além de possuírem a capacidade de sequestrar radicais livres, como o oxigênio singleto. No entanto, Silva et al. (2018) verificaram para os extratos etanólico e hexânico para os órgãos foliar, caule e sementes de *B. orellana*, resultados negativos para esses dois grupos fitoquímicos. Observamos nesse estudo, que em ambos os solventes extratores, foi evidenciado a presença de taninos hidrolizáveis pelo ensaio qualitativo que nos forneceu esse resultado pela formação da cor em tom azulado obtido logo após a adição da solução do reagente cloreto férrico 1% etanólico. Resultados similares aos obtidos por Silva e colaboradores, também não encontraram a presença de flavonoides na composição química do urucum em especial as sementes (Costa et al., 2007; Stringheta; Silva, 2008).

O grupo das catequinas com resultado negativo também foi reportado por Silva et al. (2018) para os extratos etílico e hexânico das sementes de *B. orellana*. O grupo das saponinas espimídica e hemolítica estão presentes em nossos extratos. Resultados similares também foram obtidos por Silva e colaboradores (2018) para os extratos etanólico e hexânico das sementes de urucum. As saponinas apresentam emprego farmacológico pois

podem ser utilizadas na produção de expectorantes e diuréticos e com ação hemolítica. Os fitogrupos dos flavonoides, alcaloides, triterpenóides e esteróides também são relatados no estudo de Silva et al. (2018), para os extratos etílico e hexânico da semente de *B. orellana*. Os flavonoides apresentam grande número de atividades biológicas, como: antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, antifúngicos e antivirais (Shirwaikar et al., 2004). Entre as diversas fitomoléculas do grupo dos alcaloides, alguns são tóxicos aos animais, como os pirrolizidínicos para ruminantes e equinos (Lucena et al, 2010), outros, já possuem atividades empregadas nas indústrias farmacêutica e agrícola com efeito alelopático, como a solasonina, alcaloide glicosilado que inibe o comprimento de raízes de plântulas de *Lactuca sativa* (Alves et al., 2003). Os triterpenóides conforme Nunes (2013) apresentam ações farmacológicas como anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, analgésicas, antibióticas, antimicóticas, imunomoduladoras, virostáticas e tônicas, já os esteróides apresentam atividade anti-inflamatória.

Essa diversificação de resultados obtidos e comparados a literatura, é facilmente explicado, onde vegetais de mesma espécie ou quimiotipos dessas coletados e analisados em diferentes regiões dentro de um país ou continente, podem sofrer variações quanto ao conteúdo e teores de compostos do metabolismo especial, essa variação é influenciada por efeitos bióticos, como seca, tipo de solo, ataques por insetos, animais herbívoros, fogo ou mesmo radiação solar (Alencar et al., 2005; Picchi et al., 2009; Tiveron et al., 2012).

Os carotenoides por sua vez detectados qualitativamente e quantitativamente, despertam grande interesse principalmente na indústria alimentícia, visto que, os pigmentos encontrados e quantificados nas sementes de *B. orellana* são expressos em bixina, norbixina, isobixina, orellina, β -caroteno (provitamina A), luteína, criptoxantina e zeaxantina, onde além do uso em alimentos, há grande número de atividades farmacológicas que envolvem esses carotenóides, em especial, os três primeiros dessa lista (Glew et al., 1997; Valdés et al., 2012). Nosso teor de bixina no extrato etanólico com média de 3%, encontra similar aos estudos que avaliam o teor desse carotenóide nas sementes de urucuzeiros. No estudo proposto por Júnior et al. (2021), os pesquisadores encontraram para genótipos de urucuzeiros em função da propagação, teor de bixina entre 3,95 e 4,74%. De acordo com Barbosa-Filho et al. (1998) existem no mundo mais de 40 variedades de *B. orellana*, ainda nesse estudo, os pesquisadores obtiveram teores de bixina pura com 1,3% para variedade casca verde, 1,1% para casca vermelha, 0,9% para bico de calango e 0,07% para grão preto, variedades encontradas no Estado da Paraíba, Brasil. Pedrosa et al. (1999) em um ensaio preliminar, encontrou para o teor de bixina 3,37% e para sementes armazenadas em silos de zinco 3,11% e sacos de nylon 2,47% em sementes de urucum oriundas do município de Guarabira, Estado da Paraíba, Brasil. Esses autores ainda complementam que, sementes de *B. orellana* com teores de bixina igual e superior a 2,5% são consideradas de primeira qualidade (tipo exportação).

Sabe-se que, alguns compostos fenólicos, taninos e flavonoides presentes no metabolismo especial dos vegetais nos mais diversos órgãos, apresentam efeitos de inibição de germinação, desenvolvimento do sistema radicular e aéreo de diversas sementes (espécies vegetais selvagens, domesticadas e exóticas) (Massafera, 2003). O extrato aquoso tempo 0 das sementes de *B. orellana* no estudo de Villa (2019) não apresentou diferença significativa, no entanto verificaram que a taxa de germinação sobre as sementes de *Bidens pilosa* (picão) apresentou uma redução de 12,3%. Embora os extratos das sementes de urucum em tempos superiores a 0 tenham demonstrado forte inibição de germinação, ainda nesse estudo. Com essas observações em nossos achados e comparados as literaturas, sugerimos que os compostos carotenoides presentes nas sementes de *B. orellana* em especial (bixina e norbixina) apresentam expressiva ação alelopática.

Ambos os cultivares alvo em nossa pesquisa, demonstraram serem sensíveis (germinação e desenvolvimento radicular) sobre as concentrações dos extratos aquoso e etanólico 95% das sementes de urucum, principalmente na maior concentração de 10%, em especial para o extrato etanólico. Finalizamos com o seguinte pensamento, que os carotenoides extraídos pelo sistema aquoso sobre as sementes de urucuzero nesse estudo, não foi a melhor opção, como visto nas (Tabelas 2 e 3), apresentadas anteriormente nos resultados. Acreditamos que a água não consegue ser um bom solvente extrator de carotenoides quando comparado ao excepcional resultado obtido pelo etanol 95%. E para corroborar com nossos resultados, Nelli et al. (2017) verificaram para o rendimento de carotenóides, que a combinação de diferentes solventes proporciona maior extração, como acetona/éter de petróleo; acetona/clorofórmio e acetona/hexano sobre os dois principais carotenoides betacaroteno e licopeno.

5. Conclusões

Ambos os extratos aquosos e etanólico 95% demonstraram nos ensaios fitoquímicos qualitativo com expressivo número de grupos fitoquímicos pertencentes ao metabolismo especial encontrados nas sementes de urucuzero estudado. O conteúdo do carotenóide bixina expresso quantitativamente, demonstrou que a melhor opção entre

os solventes é o etanol 95% com alto teor expressivo desse fitocompostos.

O extrato aquoso das sementes de *B. orellana* não demonstrou efeito alelopático sobre as sementes de *Zea mays* e *Glycine max* (germinação). Já o extrato etanólico 95% na maior concentração 10%, apresentou forte efeito alelopático sobre as sementes de ambas as sementes de milho e soja (alvo) (germinação). O comprimento das raízes de *Z. mays* e *Glycine max* apresentaram o menor desenvolvimento expresso pelo tamanho sobre a concentração de 10% em ambos os extratos das sementes de *B. orellana*.

Estudos futuros deverão ser realizados avaliando os compostos bixina e/ou norbixina separadamente para determinar sobre o efeito alelopático a suas influências sobre o desenvolvimento radicular e a taxa de germinação em grupos diversos de sementes de espécies alvo.

6. Agradecimentos

Ao Instituto Federal Goiano (IF Goiano), Rio Verde, Estado de Goiás, Brasil; ao Centro Universitário do Sudoeste Goiano (UniBRAS), Rio Verde, Estado de Goiás, Brasil; aos Laboratórios de Química Tecnológica e de Fitotecnia do Departamento de Agroquímica; ao Herbário do Laboratório de Sistemática Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas; aos órgãos de fomento em pesquisa, CAPES, CNPq, FINEP e FAPEG esta última, pela bolsa de doutorado para o segundo autor e a segunda pela bolsa para o último autor.

6. Referências

- Ajay, P., Amol, V., Reena, J. & Butola, B. S. (2019) Allelopathic effect of fruit trees on traditional agriculture Crops of Garhwal region. *Journal of Tree Sciences*, 37(2), 75-80. <http://dx.doi.org/10.5958/2455-7129.2018.00019.5>
- Albuquerque, M. B., Santos, R. C., Lima, L. M., Melo, P. A. F., Nogueira, R. J. M. C., Câmara, C. A. G. & Ramos, A. (2016). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. *A review. Agronomy for Sustainable Development*, 31(2), 379-395. <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2010031>
- Alcantara, F. D. O., Silva, T. I., Maciel, T. C. M., Marco, C. A. & Silva, F. B. (2018). Teor e fitoquímica do óleo essencial de manjeriço em diferentes horários de colheita. *Revista de Agricultura Neotropical*, 5(4), 1-6. <https://doi.org/10.32404/rean.v5i4.1682>
- Alencar, S. M., Aguiar, C. L., Paredes-Guzmán, J. & Park, Y. K. (2005). Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*, 35(4), 909-915. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400025>
- Alves, C. C. F., Alves, J. M., Silva, T. M. S., Carvalho, M. G. & Jacobo Neto, J. (2003). Atividade alelopática de alcaloides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. *Floresta e Ambiente*, 10(1), 93-97.
- Astaneh, N., Bazrafshan, F., Zare, M., Amiri, B. & Bahrani, A. (2018). Effect of nano chelated nitrogen and urea fertilizers on wheat plant under drought stress conditions. *Nativa*, 6(6), 587-593. <https://doi.org/10.31413/nativa.v6i6.6802>
- Barbosa-Filho, J. M., Silva-Filho, R. N., Lira, B. F., Macêdo, R. O., Silva, M. S., Chaves, M. C. O., Souza, M. F. V., Leitão-da-Cunha, E. V. & Athayde-Filho, P. F. (1998). Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 7-9(1), 42-47. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X1998000100005>
- Barrozo, M. A. S., Santos, K. G. & Cunha, F. G. (2013). Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Industrial Crops and Products*, 45, 279-282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.052>
- Braga, F. G., Bouzada, M. L., Fabri, R. L., de O Matos, M., Moreira, F. O., Scio, E. (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 396-402.
- Carvalho, I. O.; Júnior, F. A. F. X.; Evangelista, J. S. A. M.; Rodrigues, F. F. G. Costa, J. G. M (2022). Perfil químico, atividade antimicrobiana do extrato das sementes de urucum (*Bixa orellana*). *Conjecturas*, 22, n.2, 500-509, <https://doi.org/10.53660/CONJ-719-812>
- Costa, C. K. (2007). Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética. Dissertação, mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba,

Paraná, Brasil.

- Costa, S. M. L., Ferreira, M. C. & Pasin, L. A. A. P. (2015). Avaliação do potencial alelopático de ingá sobre o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas. *Acta Iguazu*, 4(1), 1-13. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v4i1.12194>
- Espinosa, R. Z., Libório, F. H. M., Silva, L. I., Zonetti, P. C., Mannigel, A. R., Felipe, D. F., Gonçalves-Zuliano, A. M. O. & Bido, G. S. (2019) Atividade alelopática de extrato aquoso de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden sobre alface (*Lactuca sativa* L.) e picão-preto (*Bidens pilosa* L.). *Revista Valore*, 4, 1-14. <https://doi.org/10.22408/rev4020193111-14>
- Ferreira, D. F. (2019), Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split polt type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529-535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>
- Garcia, A. A. & Carril, E. P. -U. (2009). Metabolismo secundário de plantas. *Reduca* (Biologia), 2(3), 119-145.
- Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Dias, J. F. G., Miguel, O. G. & Costa, C. K. (2015). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) Como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, 42(8), 1510-1517. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800029>
- Gindri, D. M. & Coelho, C. M. M. (2020). Metabólitos aleloquímicos de Lantana camara L.: potencial para o Desenvolvimento de bioherbicida – revisão. *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, 24, 1-18. <https://revistatecie.crea-pr.org.br/index.php/revista/article/view/595/455>
- Glew, R. H., Vanderjagt, D. J., Lockett, C., Grivetti, L. E., Smith, G. C. & Pastuszyn, A. (1997). Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Byrkina Faso. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 105-117. <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0539>
- Gusman, G. S., Vieira, L. R. & Vestena, S. (2017). Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. *Biotemas*, 25(4), 37-48. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n4p37>
- Hussain, M. I., Danish, S., Sánchez-Moreiras, A. M., Vicente, Ó., Jabran, K., Chaudhry, U. K., Branca, F. & Reigosa, M. J. (2021). Unraveling sorghum allelopathy in agriculture: concepts and implications. *Plants*, 10(9) <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0539>. <https://doi.org/10.3390/plants10091795>
- Júnior, E. P., Rebouças, T. N. H., São José, A. R., Souza, I. V. B. & Dias, N. O. (2021). Características de produção e teor de bixina em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.) em função da propagação. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação*, 6(2), 69-77. <https://doi.org/10.18554/rbcti.v6i2.5842>
- Nunes, F. I. A. (2013). Caracterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos. Dissertação, mestrado em Química Farmacêutica Industrial, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Mazzafera, P. (2003). Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(2), 231-238. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042003000200011>
- Mantovani, N. C., Grando, M. F., Xavier, A. & Otoni, W. C. (2013). Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. *Ciência Florestal*, 23(2), 355-362. <https://doi.org/10.5902/198050989281>
- Mendonça, V. Z., Daiuto, É. R., Furlaneto, K. A., Ramos, J. A., Fujita, E., Vieites, R. L., Tecchio, M. A. & Carvalho, L. R. (2015). Aspectos físico-químicos e bioquímicos durante o armazenamento refrigerado do caqui em atmosfera modificada passiva. *Nativa*, 3(1), 16-21. <https://doi.org/10.31413/nativa.v3i1.1856>
- Moreira, V. S., Rebouças, T. N. H., Moraes, M. O. B., São José, A. R. & Silva, M. V. (2014). Atividade antioxidante de urucum (*Bixa orellana* L.) in natura e encapsulado. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 15(2), 201-209. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81333269011>
- Nelli, S. C., Correira, A. F. K. & Spoto, M. H. F. (2017). Extração de carotenoides em minitomates desidratado (Sweete Grape) através da aplicação de diferentes solventes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20, e2016156. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.15616>
- Pedrosa, J. P., Cirne, L. E. M. R. & Neto, J. M. M. (1999). Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 3(1), 121-123. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v3n1p121-123>
- Pech-Hoil; R., Ferrer, M. M., Aguillar-Espinosa, M., Valdez-Ojeda, R., Garza-Caligaris, L. E. & Rivera-Madrid, R. (2017). Variation in the mating system of *Bixa orellana* L. (achiote) under three different agronomic systems. *Scientia Horticulturae*, 223, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.031>

- Pereira, J. C., Paulino, C. L. A., Granja, B. S., Santana, A. E. G., Endres, L. & Souza, R. C. (2018). Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. *Revista Ceres*, 65(3), 243-252. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201865030004>
- Picchi, D. G., Altei, W. F., Saito, M. S., Bozani, V. S. & Cilli, E. M. (2009). Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Química Nova*, 32(5), 1262-1277. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500033>
- Prinsloo, G. & Du Plooy, C. P. (2018). The allelopathic effects of *Amaranthus* on seed germination, growth and development of vegetables. *Biological Agriculture & Horticulture*, 34(4), 268-279. <https://doi.org/10.1080/01448765.2018.1482785>
- Rockenbach, A. P., Rizzardi, M. A., Nunes, A. L., Bianchi, M. A., Caverzan, A. & Schneider, T. (2018). Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 17(1), 59-70. <https://doi.org/10.7824/rbh.v17i1.527>
- Sanches, A. G., Costa, J. M., Silva, M. B., Moreira, E. G. S., Santana, P. J. A. & Cordeiro, C. A. M. (2017). Aspectos qualitativos e amadurecimento do araçá amarelo tratado com radiação UV-C. *Nativa*, 5(5), 303-310. <https://doi.org/10.31413/nativa.v5i5.4552>
- Shah, A. H., Zohra, L., Khan, K. R., Mehmood, A. & Farooq, M. (2018). Review on allelopathic effects of agriculture land associated plants on the different development stages of wheat crop. *International Journal of Biosciences*, 12(2), 8-13. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/12.2.8-5>
- Shirwaikar, A., Rajendran, K., Kumar, C. D. & Bloda, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 91.
- Silva, P. I., Nachtigall, A. M. & Stringheta, P. C. (2010). Eficiência de solventes na obtenção e caracterização de corantes de urucum (*Bixa orellana* L.). *Boletim CEPPA*, 28(1), 115-124. <https://doi.org/10.1007/s11627-01wqu984126-0>
- Silva, J. A. T., Zeng, S., Godoy-Hernández, G., Rivera-Madrid, R. & Dobránszki, J. (2019). *Bixa orellana* L. (achiote) tissue culture: a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 231-241. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09969-3>
- Silva, F. A., Bizerra, A. M. C. & Fernandes, P. R. D. (2018). Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (urucum). *Holos*, 2, 484-498. <https://doi.org/10.15628/holos.2018.6929>
- Silva, R. R. & Saraiva, T. S. (2018). Efeitos alelopáticos de extrato aquoso de serrapilheira de um clone de eucalipto (Gerdau GG100). *Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias*, 3(1), 42-56. <https://ojs.fccvirtual.com.br/index.php/REVISTA-AGRO/article/view/29>
- Silva, E. S., Santos, C. A., Dias, K. S., Souza, M. A., Dos Santos, A. F. & Júnior, J. M. S. (2018). Cenário das pesquisas sobre alelopátia no Brasil e seu potencial como estratégia na diminuição da utilização de pesticidas que provocam poluição ambiental: uma revisão integrativa. *Diversitas Journal*, 3(2), 442-454. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v3i2.648>
- Silveira, A. J., Finzi, R. R., Neto, L. D. C., Maciel, G. M., Beloti, I. F. & Jacinto, A. C. P. (2019). Genetic dissimilarity between lettuce henotypes with different levels of carotenoids biofortification. *Nativa*, 7(6), 656-660. <https://doi.org/10.31413/nativa.v7i6.7331>
- Soares, A. M. S. & Machado, O. L. T. (2007). Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica*, 1(1), 9-19.
- Sonam, M., Singh, R. P. & Pooja, S. (2017). Phytochemical screening and TLC profiling of various extracts of *Reinwardtia indica*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9, 523-527. [10.25258/phyto.v9i2.8125](https://doi.org/10.25258/phyto.v9i2.8125)
- Stringheta, P. C. & Silva, P. I. (2008). Pigmentos de urucum extração, reações químicas, usos e aplicações. Viçosa: Suprema.
- Tiveron, A. P., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Vieira, T. M. F. S., Regitano-d'Arce, M. A. B. & Alencar, S. M. (2012). Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8943-8957. <https://doi.org/10.3390/ijms13078943>
- Valdés, A. F-C., Martínez, J. M., Rodríguez, D. A., Lizama, R. S. & Gaitén, Y. G. (2011). Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(2), 181-185. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200013

- Villa, T. C. (2019). Potencial alelopático de *Bixa orellana* L. sobre sementes de *Bidens pilosa* L. e *Raphanus sativus* L. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019, 67 f. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4411> Acesso em: 30 de Novembro de 2022.
- Villa e Vila, V., Wenneck, G. S., Terassi, D. S., Rezende, R. & Saath, R. (2022). Spad index as na indirect estimate of chlorophyll content in okra plants. *Revista de Agricultura Neotropical*, 9(2), e6787. <https://doi.org/10.32404/rean.v9i2.6787>
- Yabiku, H. Y. & Takahashi, M. Y. (1992). Determinação de bixina em sementes de urucum: estudo colaborativo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 52(1/2), 31-36. <https://doi.org/10.622475-274740-2>

Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).