

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**KAMILLA PACHECO GOVÊA**

**POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE CUMARINAS DERIVADAS DO  
EUGENOL EM BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa* L.**

Alfenas/MG  
2018

**KAMILLA PACHECO GOVÊA**

**POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE CUMARINAS DERIVADAS DO  
EUGENOL EM BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Coorientadora: Dra. Luciene de O. R. Trindade

Colaboradores: Prof. Dr. Diogo T. Carvalho

(ICF/UNIFAL-MG)

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

(ICN/UNIFAL-MG)

Rafaella Sueko Tomita Pereira

(Bolsista PIBIC/CNPq)

Mateus Donizetti O. de Assis

(Mestrando do PPGCA)

Pâmela Ingrid Alves

(Bolsista de IC – FAPEMIG)

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central - Sede

Govêa, Kamilla Pacheco  
C721p Potencial aleloquímico de cumarinas derivadas do eugenol em  
bioensaios com *Lactuca sativa* L. / Kamilla Pacheco Govêa. -- Alfenas/MG,  
2018.  
64 f. : il. -

Orientador: Sandro Barbosa.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal  
de Alfenas, 2018.  
Bibliografia.

1. Alface. 2. Bioensaios. 3. Enzimas -- Antioxidante. 4. Testes de  
Toxicidade. 5. Índice Mitótico. 6. Cromossomos -- Aberrações. I. Barbosa,  
Sandro. II. Título.

CDD-583.99



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG  
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000  
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)  
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>




KAMILLA PACHECO GOVÊA

“POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE CUMARINAS DERIVADAS DO EUGENOL EM  
BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa* L.”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências  
Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Sandro Barbosa  
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro  
Instituição: UFSJ

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza  
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãs  
e amigos que me acompanharam nesta trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Aos deuses, entidades, energias e forças, por firmarem meus pés no chão e guiarem meus passos;

Aos meus familiares: minha mãe (Carla), meu pai (Maurício), minhas irmãs de sangue ou de coração (Alina, Juliana, Raphaelli, Hewayne e Luiza), pelo amor incondicional; meus bisavós (João e Vera), por nortearem toda nossa família ao caminho do bem; meus avós maternos (Raquel e Luiz Carlos), pelo apoio, carinho e cuidado de sempre; meus avós paternos (Joaquim e Maria José – *in memoriam*), por me ensinarem que com humildade a gente conquista o mundo; meus tios-avós (Vera Lúcia e Miguel Ângelo), pelas tantas horas de conversas de alma; meus tios e primos (Raphael, Rodolpho, Ralph, Gabriel, Daniel, Pablo e Diego) por me ensinarem que viver não cabe no Lattes; minhas tias e primas (Maria Inez, Monique, Nadja, Verônica e Adalynie) por me inspirarem e mostrarem a força que é ser mulher;

Ao meu namorado, Natanael Sakuno, pela paciência, cuidado, amor e por dividir meus momentos de alegria e angústia, por construir este caminho junto comigo;

Ao meu orientador, professor Dr. Sandro Barbosa, pela oportunidade e confiança em mim depositada desde o primeiro dia de trabalho, por todos os ensinamentos acadêmicos e principalmente não-acadêmicos que levarei comigo para sempre “introjetados”, e por acreditar em mim até quando eu mesma não acreditei;

À minha coorientadora, Dra. Luciene de O. R. Trindade, por todos os momentos compartilhados e por me mostrar que é possível viver a academia com serenidade e doçura, além da pressão e correria;

À Denise, secretária do PPGCA, por todas as vezes que me ouviu, me aconselhou, me acalmou e acreditou no meu potencial;

Aos meus amigos-irmãos de república, Valdeci Júnior e Elba Sharon, por toda a paciência, carinho e por me mostrarem que família vai além dos laços sanguíneos;

A todos os meus amigos e amigas de Alfnas e também aos que já foram embora (Marina Oliveira, Gabriele Santos, Rafael Mitsuo, Gabriela Azevedo, Priscila Romanatti, Antonio Neto, Matheus Espanha, Aline Pereira, Bárbara Amâncio, Vitor Costella, Letícia Leite, Danilo Augusto, Valdir Veroneze, Thais Fuentes e Pedro Martins), por me mostrarem que não estou sozinha;

À Gabriela Ezequiel, pelo companheirismo, pelo dia a dia, pelas risadas e por ser meu norte, meu exemplo e minha amiga;

À dona Ciomara, por todas as vezes que me ofereceu um colinho de mãe longe de casa;  
À Rafaella Sueko, minha amiga, parceira e dupla de laborário, pela valiosa contribuição neste (nosso) trabalho e por me ajudar a tornar o caminho mais leve;

A todos os colegas e companheiros do BIOGEN, com destaque especial ao Mateus Donizetti e à Pâmela Ingrid, por todos os momentos compartilhados e por me ensinarem que trabalhar com alegria e amor é o segredo da produtividade;

Aos professores Dr. Thiago Corrêa de Souza e Dr. Marcelo Polo, pelas contribuições acadêmicas, mas principalmente pelas contribuições humanas, por me ensinarem que o meu foco de hoje é a minha realidade de amanhã e por estarem sempre presentes;

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas de pesquisa; e à FAPEMIG (APQ-02123-14) pelo auxílio financeiro;

E a todos que de alguma forma, longe ou perto, direta ou indiretamente contribuíram e auxiliaram para que eu chegasse até aqui.

*Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles*  
*(Albert Einstein)*



## RESUMO

Os bioensaios vegetais são amplamente utilizados para avaliar o efeito biológico de amostras ambientais, princípios bioativos de plantas e/ou substâncias sintéticas. Para realização destes experimentos, deve-se levar em conta o substrato a ser utilizado. Os substratos têm influência direta sobre os biotestes, estando suas características físicas e químicas diretamente relacionadas ao desenvolvimento das plantas-alvo. Além disso, compostos metabólicos produzidos por plantas que possuam efeito alelopático, como o caso das cumarinas, ou seus derivados sintéticos produzidos em laboratório, podem se mostrar menos agressivos ao meio ambiente quando comparados a herbicidas químicos ou sintéticos disponíveis comercialmente. Este trabalho teve por objetivo elucidar os efeitos de quatro tipos de substratos sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L., bem como de avaliar o potencial aleloquímico de cumarinas sintéticas derivadas do eugenol sobre processos fisiológicos, citogenéticos e bioquímicos de *Lactuca sativa* L. Para padronização dos substratos, foram utilizadas 30 sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Babá de verão em cada bioensaio, sendo estes compostos por papel filtro, ágar ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ), vermiculita e substrato orgânico Mococa®. Para ação aleloquímica das cumarinas, seis cumarinas foram suspensas em ágar ( $7 \text{ g.L}^{-1}$ ) + 8% de Tween 80 para se obter a solução estoque de concentração  $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a partir da qual foram obtidas as concentrações de 50, 100, 200 e  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram realizados experimentos para verificar sua atividade sobre a germinação, crescimento inicial, comportamento do complemento cromossômico e metabolismo antioxidante enzimático do bioteste. Para a padronização de substratos, a vermiculita proporcionou o maior crescimento das plântulas, sendo, portanto, o mais indicado, considerando os bioensaios em que não seja necessária avaliação de aspectos de germinação, devido ao fato de possibilitar avaliar somente aspectos de emergência. Nos casos em que seja imprescindível avaliação de aspectos germinativos, o ágar é o substrato mais indicado, por ter proporcionado considerável crescimento das plântulas. Para avaliação do efeito aleloquímico das cumarinas, verificou-se que as seis cumarinas sintéticas avaliadas possuem ação aleloquímica, ou seja, interferem na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa*, sendo a cumarina A1 a molécula com maior potencial aleloquímico por ter promovido redução drástica de inúmeros parâmetros. Além disso, a cumarina A1 tem influência sobre o ciclo celular, reduzindo o índice mitótico e aumentando a frequência de anormalidades cromossômicas; porém, não promoveu estresse oxidativo sobre *Lactuca sativa*.

**Palavras-chave:** Alface. Padronização de bioensaios. Atividade antioxidante. Fitotoxicidade. Índice mitótico. Anormalidades cromossômicas.

## ***ABSTRACT***

Plant bioassays are widely used to evaluate the biological effect of environmental samples, bioactive compounds of plants and/or synthetic substances. To perform these types of experiments, the substrate to be used must be carefully considered. The substrates have a direct influence on biotests, being their physical and chemical characteristics directly related to the development of target plants. In addition, secondary metabolites produced by plants that have an allelopathic effect, such as coumarins, or their laboratory-produced synthetic derivatives, may be less aggressive to the environment when compared to commercially available chemical or synthetic herbicides. This work aims to elucidate the effects of four different types of substrates on the germination and initial growth of *Lactuca sativa* L., as well as to evaluate the allelochemical potential of synthetic coumarins derived from eugenol on the physiological, cytogenetic and biochemical processes of *Lactuca sativa* L. For the standardization of the substrates, were used 30 seeds of *Lactuca sativa* L. cv. Babá de verão in each bioassay, which was composed of filter paper, agar (6 g.L<sup>-1</sup>), vermiculite and organic substrate Mococa®. For allelochemical action of coumarins, each coumarin was suspended in agar (7 g.L<sup>-1</sup>) + 8% de Tween 80 to obtain the stock solution of concentration 800 µg.mL<sup>-1</sup>, from which the concentrations of 50, 100, 200 e 400 µg.mL<sup>-1</sup> were obtained. Experiments were performed to verify its activity on germination, initial growth, chromosomal complement behavior and enzymatic antioxidant metabolism of the biotest. For the standardization of substrates, vermiculite provided the greatest growth of the seedlings, being therefore the most indicated, considering the bioassays in which it is not necessary to evaluate aspects of germination, due to the fact that it is possible to evaluate only emergency aspects. In cases where it is essential to evaluate germination aspects, agar is the most suitable substrate, since it has provided considerable growth of the seedlings. To evaluate the allelochemical effect of coumarins, it was verified that the six synthetic coumarins evaluated presented allelochemical action, that is, they interfere in the germination and initial growth of *Lactuca sativa* seedlings, being the coumarin C1 the molecule with greater allelochemical potential for promoting drastic reduction of many parameters. In addition, coumarin C1 has influence on the cell cycle, reducing the mitotic index and increasing the frequency of chromosomal abnormalities; however, did not promote oxidative stress on *Lactuca sativa*.

**Keywords:** Lettuce. Standardization of bioassays. Antioxidant activity. Phytotoxicity. Mitotic index. Chromosomal abnormalities.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b>	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b>	15
2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS E ALELOPATIA	15
2.2 EUGENOL E MECANISMOS DE AÇÃO DE HERBICIDAS	17
2.3 AS CUMARINAS COMO POTENCIAIS HERBICIDAS	19
2.4 PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS E AS VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> L.	21
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	23
<b>4 OBJETIVOS</b>	24
4.1 OBJETIVO GERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b>	25
<b>REFERÊNCIAS</b>	26
<b>PARTE II</b>	32
ARTIGO I	33
ARTIGO II	45

## **PARTE I**

### **1 INTRODUÇÃO**

Bioensaios vegetais são empregados para avaliação de efeito biológico de agentes bióticos e abióticos, e para a realização de um bioensaio bem planejado, o substrato utilizado deve ser cuidadosamente escolhido. Os substratos têm influência direta sobre os biotestes, estando suas características físicas e químicas diretamente relacionadas ao crescimento inicial das plantas-alvo (SILVA; SIMÕES; SILVA, 2012; VARELA; COSTA; RAMOS, 2005). Dentre os diversos tipos de substratos utilizados em experimentos, pode-se citar papel filtro, ágar, vermiculita e substrato orgânico. Cada um destes substratos possui vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento da escolha da condução experimental.

Recentemente, muitas espécies de ervas daninhas têm demonstrado resistência a inúmeros herbicidas comerciais, e devido a isso, há um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de processos alternativos que sejam baseados em produtos naturais para controlar essas plantas. Estes processos alternativos podem contribuir com a redução do emprego de herbicidas químicos comerciais e conseqüentemente minimizar impactos ambientais causados por sua utilização indiscriminada. Buscando alcançar este objetivo, produtos do metabolismo vegetal como compostos fenólicos, classes de terpenóides, mucilagens, dentre outros, têm sido identificados como substâncias responsáveis pela inibição do crescimento e do desenvolvimento de plantas invasoras, proporcionando a possibilidade de serem explorados como herbicidas naturais (ANESE et al., 2015; CORDEAU et al., 2016; FAROOQ et al., 2011; PES et al., 2016; RAZAVI, 2011). Ao processo de interferência de metabólitos vegetais sobre outras plantas é dado o nome de alelopatia, e tal interferência pode ser negativa ou positiva, de modo que auxilie o estabelecimento e/ou desenvolvimento da planta que os sintetiza, garantindo uma vantagem competitiva (RICE, 1964; REIGOSA et al., 2013).

Dentro deste contexto, um dos grandes grupos de metabólitos secundários produzidos por plantas é o grupo das cumarinas, que são lactonas derivadas de compostos fenólicos. De acordo com Kuster e Rocha (2007), os compostos cumarínicos são especialmente isolados de plantas superiores mas também podem ser sintetizados por microrganismos, e estudos anteriores vêm demonstrando diversas bioatividades que indicam que essas substâncias podem ser exploradas como alternativas aos herbicidas comerciais (DIAS; NOZARI; SANTARÉM, 2017; HOUSSAIN; QAMAR-ABBAS; REIGOSA, 2017; RAZAVI, 2011; WU et al., 2016).

Além disso, as cumarinas podem ser sintetizadas e/ou modificadas em laboratório, formando novos análogos estruturais com alto potencial fitotóxico (ARANITI et al., 2015).

Para que seja possível estudar e compreender os efeitos de compostos bioativos de plantas bem como de substâncias sintéticas, os bioensaios vegetais têm sido amplamente utilizados. Alguns trabalhos na literatura tratam sobre os principais efeitos das cumarinas sobre o crescimento e desenvolvimento inicial de plantas, porém os estudos se tornam muito escassos quanto às alterações no ciclo celular e no metabolismo antioxidante sobre modelos vegetais causadas por essas substâncias.

Nesse sentido, determinar o efeito biológico de cumarinas sobre biotestes vegetais torna-se necessário no intuito de subsidiar estudos para a possível utilização dessas substâncias como uma alternativa mais ecologicamente viável quando comparada aos herbicidas comerciais.

## 2 DESENVOLVIMENTO

A seguir, acompanha revisão de literatura atualizada acerca dos temas abordados nesta dissertação, com intuito de gerar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados obtidos.

### 2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS E ALELOPATIA

O metabolismo das plantas pode ser definido como o conjunto total de transformações das moléculas orgânicas, responsável por suprir o organismo de energia e garantir a estabilidade fisiológica ou homeostase. Existem dois tipos de metabolismo nas plantas: o metabolismo primário e o metabolismo secundário. O metabolismo primário verifica-se em todo o reino vegetal e está estritamente relacionado a processos essenciais para as plantas, como a síntese de celulose, lignina, proteínas, açúcares, lipídios e outras substâncias vitais para o funcionamento do organismo. O metabolismo secundário é responsável pela síntese de compostos químicos que possuem distribuição mais restrita no reino vegetal, e normalmente apresentam estrutura complexa e notáveis atividades biológicas, podendo-se citar como exemplo a alelopatia (BERG; LUBERT, 2008; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008; MARZZOCO; TORRES, 2007).

Inúmeros autores consideram os metabólitos secundários como substanciais para a sobrevivência e a perpetuação das espécies de plantas, visto que garantem proteção contra predadores e patógenos, podem funcionar como compostos alelopáticos (conferindo vantagem competitiva em relação a outras plantas), e auxiliar na atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes, na proteção contra radiações, no armazenamento de nitrogênio e na regulação do balanço hídrico das plantas (BAIS et al., 2003; CANHOTO, 2010; FITTER, 2003; INDERJIT; KARBAN; CALLAWAY, 2011; WINK, 2010).

As plantas coexistentes em um determinado ambiente estão sujeitas às interações ecológicas, dentre as quais pode-se destacar a competição. Plantas que vivem em comunidade competem por recursos básicos à sobrevivência, como intensidade luminosa, disponibilidade de água e nutrientes. Essa concorrência incessante está diretamente relacionada à manutenção



do equilíbrio do ecossistema, e algumas espécies desenvolvem mecanismos de defesa que garantem vantagem adaptativa e que se baseiam na síntese de determinados metabólitos liberados no ambiente que irão afetar alguma etapa do ciclo de vida de outra planta ou organismo, caracterizando a alelopatia (GONÇALVES, 2015; LARA-NUÑEZ et al., 2006).

A alelopatia pode ser descrita como uma interação entre duas plantas, na qual um vegetal sintetiza metabólitos (aleloquímicos) que terão efeito sobre o outro. Tal efeito pode ser positivo/estimulatório ou negativo/inibitório, de forma que assegure o fornecimento de água, luz e nutrientes para o organismo sintetizante. Esta capacidade é considerada um fator importante nas interações ecológicas, tanto em ambientes naturais quanto em agroecossistemas (AN, 2005; BLANCO, 2007; DUKE, 2015; HIERRO; CALLAWAY, 2003). Os aleloquímicos podem estar presentes no meio ambiente de diversas formas, como por exemplo, na mucilagem que circunda uma semente em germinação, nos lixiviados da parte aérea das plantas, nos exsudados das raízes, nas emissões voláteis das plantas em crescimento e também entre os resíduos das plantas em decomposição onde os microrganismos podem estar incluídos (BOND, 2002; RAZAVI, 2011).

Depois de liberados no meio ambiente, os aleloquímicos podem atuar sobre a planta alvo de forma direta ou indireta. Na interferência direta, os compostos provocam modificações celulares e/ou metabólicas, dentre as quais podem-se citar alterações no funcionamento das membranas, na absorção de água e/ou nutrientes, na atividade fotossintética, respiratória, enzimática, fito-hormonal, dentre outras. Na interferência indireta, as alterações são realizadas externamente à planta-alvo, podendo interferir nas características inorgânicas do solo, como na disponibilidade de nutrientes, ou orgânicas, como nas populações e atividades dos organismos que o habitam (BAIS et al., 2003; BORELLA et al., 2009; DUKE et al., 2010; FERREIRA; AQUILA, 2000; HIERRO; CALLAWAY, 2003).

Dentro deste contexto, entende-se que, para que uma substância tenha potencial aleloquímico, ela deve interferir em alguma etapa da germinação e/ou do crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais. Potencial aleloquímico é, portanto, a capacidade que determinada substância tem de influenciar positiva ou negativamente no metabolismo de uma planta. Assim, substâncias com potencial aleloquímico podem ser os próprios metabólitos vegetais em ambiente natural, metabólitos isolados quimicamente, extratos vegetais, componentes de amostras ambientais ou substâncias tanto sintéticas como semissintéticas produzidas em laboratório.

## 2.2 EUGENOL E MECANISMOS DE AÇÃO DE HERBICIDAS

Eugenol é um composto fenólico volátil e é o principal constituinte do óleo extraído do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), sendo, portanto, um metabólito secundário. Esta substância é a principal responsável pelo cheiro e sabor característicos do cravo-da-índia, e possui diversas bioatividades relatadas na literatura, com destaque para terapêutico, anestésico, antioxidante, bactericida, nematocida, fungicida, anti-viral, inseticida e, mais recentemente, vem sendo estudado seu potencial alelopático (MAZZAFERA, 2003; PARANHOS et al., 2005; PRAKASH; GUPTA, 2005; ROZWALKA et al., 2008; SCHERER et al., 2009; SILVESTRI et al., 2010; VIDAL et al., 2006). Devido à capacidade anestésica e bactericida, é amplamente utilizado na odontologia, como exposto por Silva, Oliveira e Souza (2011), o que permite que seja possível obtê-lo comercialmente, seja quimicamente isolado ou sinteticamente produzido. O eugenol pode, ainda, ter sua estrutura química modificada em laboratório, servindo como um importante precursor para outras formas químicas de eugenol e outras substâncias (CISZEWSKI; MILCZAREK, 2001; KISHORE; KANNAN, 2004; UEDA; TSE, 1982).

De acordo com a literatura, o potencial alelopático do eugenol é verificado de diversas formas, como na redução ou inibição sonda germinação, inibição do crescimento e desenvolvimento de plântulas, inibição do desenvolvimento de parte aérea e inibição do crescimento da raiz (MAZZAFERA, 2003; PRAKASH; GUPTA, 2005). Borooh (2011) relatou a atividade antimitótica em células meristemáticas de cebola promovida pelo extrato vegetal aquoso de *Ocimum gratissimum* L., o qual possui o eugenol como principal constituinte; e Afify et al. (2012) verificaram a atividade dos óleos essenciais de cominho e cravo-da-índia (ambos majoritariamente constituídos por eugenol) no metabolismo antioxidante enzimático em tubérculos de batata. Porém, não foram encontrados na literatura estudos sobre a interferência do eugenol isolado no ciclo celular e no metabolismo antioxidante de biotestes vegetais.

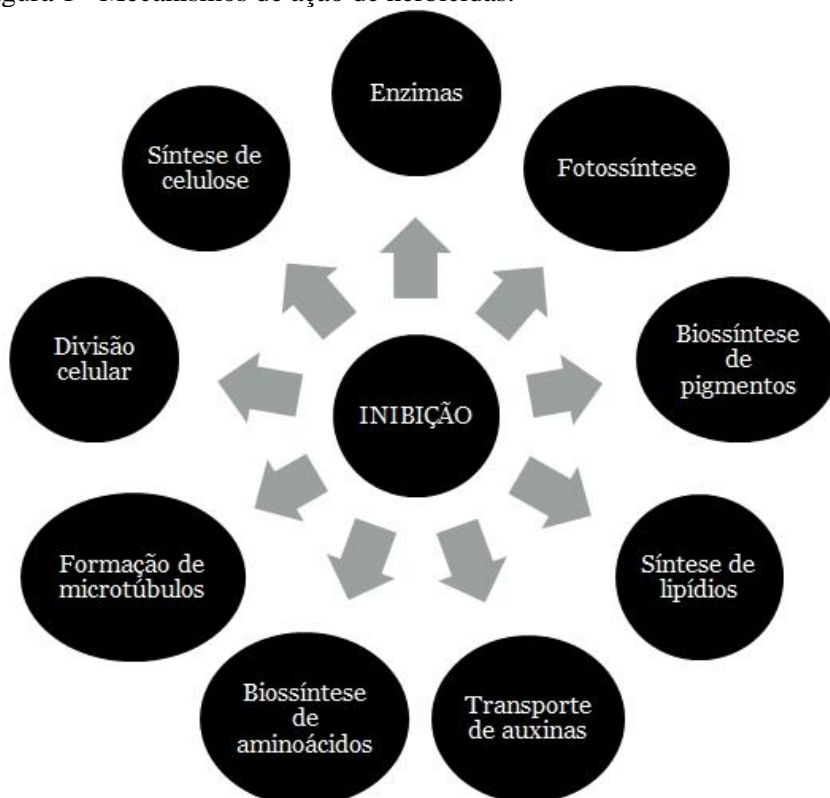
Recentemente, muitas espécies de ervas daninhas vêm apresentando resistência aos mais variados tipos de herbicidas comerciais, e devido a isso, há um interesse crescente pela busca de processos alternativos baseados em produtos naturais para controlar essas plantas. Estes processos alternativos podem reduzir o emprego de herbicidas químicos comerciais de forma a minimizar impactos ambientais causados por sua utilização desregada.

Com relação aos herbicidas, pode-se classificá-los de diversas formas, de acordo com diferentes características e informações. Num cenário ideal, o herbicida utilizado deve ser

altamente seletivo a plantas e não-tóxico a outros organismos, agir rapidamente e efetivamente em baixas doses e/ou concentrações, ser rapidamente degradado no meio ambiente e apresentar baixo custo de produção e consumo. No entanto, poucos produtos disponíveis no mercado satisfazem todos esses critérios. A fim de demonstrar um elevado grau de seletividade, devem ser utilizados produtos que agem em sítios-alvo exclusivos às plantas, uma vez que os mesmos devem oferecer pouca ou nenhuma toxicidade a organismos não-alvo (ou não-vegetais). O número de sítios-alvo onde herbicidas podem agir varia de 15 a 20, ou seja, é substancialmente baixo quando se considera os milhares de reações que ocorrem em um organismo vegetal (READE; COBB, 2002).

Na literatura, verifica-se que existem inúmeros mecanismos de ação dos herbicidas (Figura 1) sobre as plantas invasoras, podendo-se citar como exemplos a inibição de diferentes enzimas, inibição da fotossíntese, da biossíntese de pigmentos (clorofila e carotenoides), da síntese de lipídios, do transporte de auxinas, da biossíntese de aminoácidos, da formação de microtúbulos, da divisão celular, da síntese de celulose, entre outros mecanismos (DUKE, 1990; MALLORY-SMITH; RETZINGER JR, 2003; READE; COBB, 2002).

Figura 1 - Mecanismos de ação de herbicidas.



Fonte: do autor.

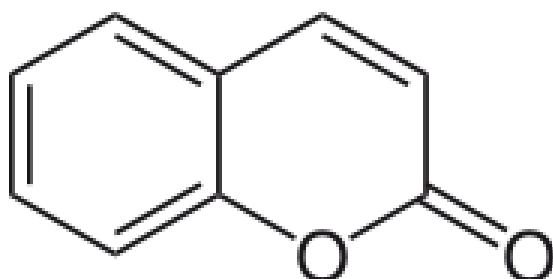
### 2.3 AS CUMARINAS COMO POTENCIAIS HERBICIDAS

Para realização do presente trabalho, o eugenol teve sua estrutura química modificada em laboratório para dar origem às cumarinas sintéticas aqui estudadas. O eugenol foi, portanto, um precursor a partir do qual foi gerado uma estrutura química comum a todas as cumarinas tratadas aqui (núcleo cumarínico), as quais se diferenciavam em estrutura por farmacóforos distintos em seus radicais.

De acordo com Razavi (2011), as cumarinas são conhecidas como um grande grupo de metabólitos secundários de plantas, oriundas principalmente da via do ácido chiquímico. São amplamente distribuídas nos vegetais, principalmente naqueles ditos como superiores, mas também podem ser encontradas em microrganismos como fungos e bactérias. Em sua estrutura, são lactonas derivadas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo o representante mais simples a cumarina *per se* (1,2-benzopirona), cujo nome provém do caribenho *Cumarú*, nome popular da espécie *Dipterix odorata*, pertencente à família Fabaceae (KUSTER; ROCHA, 2007). Atualmente, cerca de 1400 cumarinas já foram descritas, caracterizadas e isoladas de fontes naturais (SANTOS; SIQUEIRA; SILVA-FILHO, 2013).

O núcleo básico de todas as cumarinas é resultante da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (Figura 2).

Figura 2 - Núcleo cumarínico ou cumarina *per se*.



Fonte: Wikipédia, 2016.

Elas podem ser classificadas como cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas diméricas. As cumarinas simples são derivadas da cumarina *per se*, isto é, possuem o anel principal das cumarinas e inúmeros possíveis grupos substituintes, como hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, dentre outros. Excetuando-se a cumarina *per se*, todas as cumarinas apresentam uma substituição por um grupo hidroxila na posição 7, e estes grupos hidroxila podem ser metilados ou glicosilados. Além disso, é também comum a lipidação em

diversas posições do núcleo cumarínico, o que em alguns casos, como lipidação em C-6 ou C-8, origina as piranocumarinas ou furanocumarinas lineares e angulares, respectivamente. As cumarinas diméricas ou biscumarinas são compostos “espelhados”, como se duas moléculas idênticas fossem unidas, e são representadas pelo dicumarol ou isocumarinas (BOURGAUD et al., 2006; KUSTER; ROCHA, 2007; LACY; O’KENNEDY, 2004).

As cumarinas encontram-se distribuídas predominantemente em angiospermas, sendo mais encontradas as estruturas mais simples. Furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas diméricas são encontradas somente em algumas poucas famílias, notadamente mais primitivas. As famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo de cumarinas são Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae, Thymelaceae, Lamiaceae, Solanaceae, Poaceae e Umbelliferae (KUSTER; ROCHA, 2007; RAZAVI, 2011; SANTOS; SIQUEIRA; SILVA-FILHO, 2013). Cumarinas podem, ainda, ser isoladas quimicamente das espécies vegetais que as produzem ou serem sintetizadas em laboratório, tendo vários representantes sintéticos e seus efeitos relatados na literatura (ARANITI et al., 2015; FARLEY et al., 2016; KLENKAR; MOLNAR, 2015; NEELGUNDMATH et al., 2015).

As cumarinas possuem diversas bioatividades, contribuem essencialmente para a perpetuação das plantas, estão envolvidas em processos como a defesa contra fitopatógenos, resposta ao estresse abiótico, regulação do estresse oxidativo, possível regulação hormonal e alterações na microbiota do solo (BOURGAUD et al., 2006; CABELLO-HURTADO et al., 1998; NIRO et al., 2016). Além disso, possuem ação fitotóxica, fungicida, inseticida, antibacteriana, nematocida, anti-HIV, anti-tuberculose, anti-alzheimer, anti-inflamatória, imunomodulatória e antimelanogênica (BOURGAUD et al., 2006; FLAVIN et al., 1996; KARIMI et al., 2010; ONG et al., 2011; RAVAL et al., 2008; RAZAVI, 2011; SANDEEP et al., 2009). Na indústria alimentícia, podem ser utilizadas em bebidas alcoólicas e como corantes ou essências, e na indústria de cosméticos, como fixador. As cumarinas também são utilizadas em diversas áreas como borrachas sintéticas, plásticos, inseticidas, detergentes, cigarros, tintas, sprays e como corantes de painéis solares (SANTOS; SIQUEIRA; SILVA-FILHO, 2013).

Trabalhos realizados com cumarinas e seus derivados demonstraram que essa substância pode inibir a germinação, o crescimento e desenvolvimento inicial, bem como bloquear a mitose de inúmeros biotestes e provocar anormalidades cromossômicas (GRAÑA et al., 2017; HOUSSAIN; QAMAR-ABBAS; REIGOSA, 2017; SUKSUNGWORN et al., 2017; WU et al., 2016; YAN et al., 2016). Também são encontrados estudos sobre o efeito de cumarinas sobre o metabolismo antioxidante enzimático de espécies vegetais (ARANITI et al., 2017; HOUSSAIN; QAMAR-ABBAS; REIGOSA, 2017). Alguns trabalhos relatam o potencial

alelopático das cumarinas sobre a Alface, inibindo a germinação, o alongamento radicular e o alongamento caulinar (RAZAVI; IMANZADEH; DAVARI, 2010; TAKEMURA et al., 2013). Tudo isso demonstra a possibilidade de aplicação dessas substâncias como alternativas aos herbicidas comerciais, visto que podem causar danos em inúmeros sítios e etapas do metabolismo vegetal.

As seis cumarinas sintéticas derivadas do eugenol estudadas neste trabalho nunca foram antes testadas em modelos vegetais, sendo, portanto, inédito seu efeito sobre plantas.

#### 2.4 PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS E AS VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE *Lactuca sativa* L.

Para que seja possível avaliar o efeito biológico de amostras ambientais, princípios bioativos de plantas e/ou substâncias sintéticas, os bioensaios vegetais têm sido amplamente utilizados (ARANITI et al., 2015; CORDEAU et al., 2016; MARONEZE et al., 2014; MORAES et al., 2015; PERGO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012). Inúmeras espécies podem ser utilizadas como plantas-alvo de atividade biológica, podendo-se citar Tomate, Rabanete, Salsa, Soja, Sorgo, Milho, Picão-preto, Mostarda, Braquiara, Alface e Cebola, sendo as duas últimas as mais utilizadas por possuírem particularidades que facilitam seu uso (SANTOS et al., 2017; SIMÕES et al., 2013).

Além da espécie-alvo selecionada para uso, o substrato a ser utilizado no bioensaio deve ser cuidadosamente escolhido. Os substratos têm influência direta sobre os biotestes, estando suas características físicas e químicas diretamente relacionadas ao desenvolvimento das plantas-alvo, como aeração, capacidade de retenção de água, grau de infestação de patógenos, dentre outros (SILVA; SIMÕES; SILVA, 2012; VARELA; COSTA; RAMOS, 2005). De acordo com Brasil (2009), a escolha do substrato deve ser feita considerando o tamanho da semente, sua necessidade de água, sua sensibilidade ou ausência dela em relação à luz e a facilidade que oferece para realização das avaliações. Neste sentido, verifica-se a importância de se padronizar o bioensaio de acordo com o tipo de substrato, com o intuito de estabelecer a metodologia mais adequada à resposta que se necessita.

Dentre os diversos tipos de substratos utilizados para avaliação de efeito biológico e/ou desenvolvimento de plantas, pode-se citar papel filtro, ágar, vermiculita e substrato orgânico. Cada um destes substratos possui vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no

momento da escolha do método para condução experimental do bioensaio. Neste trabalho, procurou-se comparar os substratos com relação ao crescimento das plantas proporcionado por eles.

As principais vantagens do uso de *Lactuca sativa* L. como alvo nos estudos quimioecológicos reside na sensibilidade da espécie, mesmo em baixas concentrações de compostos testados, e baixo custo de pesquisa. Além disso, a espécie apresenta outras peculiaridades que favorecem sua utilização como: germinação rápida em aproximadamente 24h; crescimento linear em ampla faixa de variação de pH; baixa sensibilidade a potenciais osmóticos; estabelecimento da planta com aproximadamente 21 dias; pequeno número de cromossomos ( $2n = 2x = 18$ ) e presença de cromossomas grandes, sendo as duas últimas características vantajosas para análises citogenéticas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MORAES et al., 2015; RICE, 1984; SIMÕES et al., 2013; SMIDERLE et al., 2001; SOUSA et al., 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

Bioensaios vegetais são empregados para avaliação de efeito biológico de agentes bióticos e abióticos, e, para tal fim, o substrato utilizado deve ser cuidadosamente escolhido, devido ao fato de suas características interferirem diretamente no desenvolvimento das plantas-alvo. Além disso, metabólitos secundários com efeito alelopático produzidos por plantas, como o caso das cumarinas, ou seus derivados sintéticos produzidos em laboratório, podem se mostrar menos agressivos ao meio ambiente quando comparados a herbicidas comerciais.

Trabalhos realizados com cumarinas e seus derivados demonstraram que essa substância pode inibir a germinação, o crescimento e desenvolvimento inicial, bloquear a mitose e interferir no metabolismo antioxidante enzimático de plantas, podendo ser eficazmente investigada como um herbicida menos agressivo ao ambiente. Além disso, as moléculas avaliadas neste trabalho ainda não foram testadas em bioensaios vegetais, de modo que sua atividade e mecanismos de ação sobre o bioteste são totalmente desconhecidos.

Assim sendo, verifica-se a importância de elucidar os efeitos de diferentes substratos sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L., no intuito de auxiliar na escolha do substrato adequado para estudos com esta espécie; bem como de avaliar o potencial aleloquímico das cumarinas sintéticas derivadas do eugenol que possuem ação desconhecida em modelos vegetais, de modo a subsidiar outras pesquisas que venham a utilizar dessas substâncias como alternativa aos herbicidas convencionais.



## 4 OBJETIVOS

A seguir, são apresentados os objetivos gerais e específicos dos dois artigos gerados nesta dissertação.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os efeitos de quatro tipos diferentes de substratos sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. e avaliar o potencial aleloquímico de cumarinas sintéticas derivadas do eugenol sobre processos fisiológicos, citogenéticos e bioquímicos de *Lactuca sativa* L.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elucidar os efeitos dos substratos papel filtro, ágar, vermiculita e substrato orgânico sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.

Ranquear moléculas de cumarinas sintéticas quanto ao efeito fitotóxico para que, posteriormente, a molécula mais responsiva seja caracterizada quanto ao seu modo de ação.

Avaliar aspectos fitotóxicos da ação das cumarinas analisando a germinação e crescimento inicial do bioteste *Lactuca sativa* L. como parâmetros para ranqueamento das moléculas.

Estudar, por meio dos efeitos sobre o ciclo celular e o comportamento do complemento cromossômico do bioteste, a citogenotoxicidade da cumarina selecionada.

Verificar o modo de ação da cumarina selecionada analisando a produção de espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante do sistema enzimático do bioteste.

## **5 CONCLUSÃO GERAL**

Conclui-se que, dentre os substratos avaliados, a vermiculita proporcionou o maior crescimento das plântulas, porém não permite avaliação de parâmetros germinativos, apenas de emergência. Nos casos em que seja indispensável a análise de parâmetros germinativos, o ágar é o substrato mais adequado, pois viabiliza considerável crescimento das plântulas.

Com relação às cumarinas sintéticas, as seis possuem ação aleloquímica, sendo a cumarina A1 a molécula mais tóxica, responsável também por influenciar o ciclo celular e aumentar a frequência de anormalidades cromossômicas. Porém, estes efeitos não podem ser correlacionados a um possível estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- AFIFY, A. E. M. M. R. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation as biomarker for potato tuber stored by two essential oils from Caraway and Clove and its main component carvone and eugenol. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S772–S780, 2012.
- AN, M. Mathematical modelling of dose-response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 153–172, 2005.
- ANESE, S. et al. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miens roots. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 28–35, 2015.
- ARANITI, F. et al. Phytotoxic Potential and Biological Activity of Three Synthetic Coumarin Derivatives as New Natural-Like Herbicides. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17883–17902, 2015.
- ARANITI, F. et al. Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated -omic approach. **Journal of Plant Physiology**, v. 213, p. 30–41, 2017.
- BAIS, H. P. et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, p. 1377–1380, 2003.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545 p.
- BLANCO, J. A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling**, v. 209, n. 2, p. 65–77, 2007.
- BORELLA, J. et al. Allelopathic effect of aqueous extracts of *Persea americana* Mill. on *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, p. 260–265, 2009.
- BOROOAH, D. D. Genotoxicity assessment of water extract of *Ocimum gratissimum* L. using the *Allium cepa* assay. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 185–188, 2011.
- BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 293–308, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009.
- CABELLO-HURTADO, F. et al. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1029–1036, 1998.
- CANHOTO, J. **Biociência Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação**

**Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra. 2010.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 533p.

CISZEWSKI, A.; MILCZAREK, G. Preparation and General Properties of Chemically Modified Electrodes Based on Electrosynthesized Thin Polymeric Films Derived from Eugenol. **Electroanalysis**, v. 13, n. 10, p. 860–867, 2001.

CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44–49, 2016.

DIAS, M. P.; NOZARI, R. M.; SANTARÉM, E. R. Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. **Allelopathy Journal**, v. 42, n. 1, p. 21–35, 2017.

DUKE, S. O. Overview of herbicide mechanisms of action. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 263–271, 1990.

DUKE, S. O. et al. Natural toxins for use in pest management. **Toxins**, v. 2, p. 1943–1962, 2010.

DUKE, S. O. Proving Allelopathy in Crop – Weed Interactions. **Weed Science**, n. 121, p. 121–132, 2015.

EINSTEIN, A. 20 pensamentos de Einstein que todo aluno deveria saber. **Epoch Times**, 12 mai. 2014. Disponível em: < <https://www.epochtimes.com.br/20-pensamentos-de-einstein-que-todo-aluno-deveria-saber/>>. Acesso em: 12/03/2018.

FARLEY, C. M. et al. Evaluation of synthetic coumarins for antiausterity cytotoxicity against pancreatic cancers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 5, p. 1471–1474, 2016.

FAROOQ, M. et al. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493–506, 2011.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Allelopathy : an Emerging Topic in Ecophysiology. **Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 7, p. 175–204, 2000.

FITTER, A. Making allelopathy respectable. **Science**, v. 301, p. 1337–1338, 2003.

FLAVIN, M. T. et al. Synthesis, Chromatographic Resolution, and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of (+-)-Calanolide A and Its Enantiomers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1303–1313, 1996.

GONÇALVES, T. S. Ecological and evolutive interactions between: plants, herbivory and natural enemies. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 3, n. 3, p. 1–9, 2015.

GRAÑA, E. et al. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. **Journal of Plant Physiology**, v. 218, p. 45–55, 2017.

- HIERRO, J. L.; CALLAWAY, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, p. 29–39, 2003.
- HOUSSAIN, M. I.; QAMAR-ABBAS, S.; REIGOSA, M. J. Biological activities and novel applications of secondary metabolite coumarins. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–13, 2017.
- INDERJIT, D. A. W.; KARBAN, R.; CALLAWAY, R. M. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, n. 12, p. 655–662, 2011.
- KARIMI, G. et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus *Ferula*. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 566–574, 2010.
- KISHORE, D.; KANNAN, S. Double bond migration of eugenol to isoeugenol over as-synthesized hydrocalcites and their modified forms. **Applied Catalysis A: General**, v. 270, n. 1–2, p. 227–235, 2004.
- KLENKAR, J.; MOLNAR, M. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p. 1223–1238, 2015.
- KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. O. S. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Editora da UFSC, 2007. cap. 21, p. 537-556.
- LACY, A.; O’KENNEDY, R. Studies on Coumarins and Coumarin-Related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3797–3811, 2004.
- LARA-NUÑEZ, A. et al. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 11, p. 2009–2016, 2006.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.
- MALLORY-SMITH, C. A.; RETZINGER JR, E. J. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p. 605–619, 2003.
- MARONEZE, M. M. et al. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 3, p. 445–458, 2014.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 736 p.
- MAZZAFERA, P. Allelopathic effects of the alcoholic extract of clove and eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231–238, 2003.
- MORAES, R. M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca*

*sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115–121, 2015.

NEELGUNDMATH, M. et al. Novel synthetic coumarins that targets NF- $\kappa$ B in Hepatocellular carcinoma. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 4, p. 893–897, 2015.

NIRO, E. et al. Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 95, p. 30–39, 2016.

ONG, E. B. B. et al. Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 14049–14056, 2011.

PARANHOS, B. A. J. et al. Neem extract and Indian spice to control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) in storage bean seeds. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2005.

PERGO, É. M. et al. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 4, p. 499–507, 2008.

PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 42, p. 4242–4249, 2016.

PRAKASH, P.; GUPTA, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on Eugenol and its pharmacological actions: A short review. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 125–131, 2005.

RAVAL, J. P. et al. A comparative study of microwave assisted and conventional synthesis of 2,3-dihydro-2-aryl-4-[4-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-1,3-thiazol-2-ylamino]-1,5-benzothiazepines and its antimicrobial activity. **Arkivoc**, v. 12, p. 233–244, 2008.

RAZAVI, S. M. **Plant coumarins as allelopathic agents** *International Journal of Biological Chemistry*, 2011.

RAZAVI, S. M.; IMANZADEH, G.; DAVARI, M. Coumarins from *Zosima absinthifolia* seeds, with allelopathic effects. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 4, n. 3, p. 17–22, 2010.

READE, J. P. H.; COBB, A. H. Herbicides: Modes of Action and Metabolism. In: NAYLOR, R. E. L. (Ed.). **Weed Management Handbook**. 9. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2002. cap. 8, p. 134-170.

REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629–646, 2013.

RIBEIRO, L. D. O. et al. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 220–225, 2012.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2. ed. Orlando. Editora Academic Press. 1984. 422 p.

ROZWALKA, L. C. et al. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301–307, 2008.

SANDEEP, G. et al. Synthesis and Biological Screening of Some Novel Coumarin Derivatives. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 155-160, 2009.

SANTOS, S. C. DOS et al. Genotypes selection for plant bioassays using *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 6, p. 2201–2212, 2017.

SANTOS, W. H. DOS; SIQUEIRA, M. DE S.; SILVA-FILHO, L. C. DA. Synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarin derivatives catalyzed by NbCl<sub>5</sub>. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1303–1307, 2013.

SCHERER, R. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442–449, 2009.

SILVA, R. B. G.; SIMÕES, D.; SILVA, M. R. Qualidade de mudas clonais de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em função do substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 297–302, 2012.

SILVA, T. C. DA; OLIVEIRA, J. R. DE; SOUZA, S. J. DE O. DE. Extração de Eugenol a partir do Cravo da Índia e produção de sabonetes aromatizados. **Revista Crase.edu**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2011.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589–594, 2010.

SIMÕES, M. S. et al. Bioassay standardization for the detection of allelopathic compounds and environmental toxicants using lettuce. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29–36, 2013.

SMIDERLE, O. J. et al. Production of lettuce, cucumber and sweet pepper seedlings in substrate with different combinations of sand, soil and Plantmax®. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 253–257, 2001.

SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cyto genetics**, v. 62, n. 4, p. 326–333, 2009.

SUKSUNGWORN, R. et al. Coumarins from *Haldina cordifolia* lead to programmed cell death in giant mimosa: Potential bio-herbicides. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 3, p. 1173–1183, 2017.

TAKEMURA, T. et al. Discovery of coumarin as the predominant allelochemical in *Gliricidia sepium*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 25, n. 2, p. 268–272, 2013.

UEDA, C.; TSE, D. C. Stability of Catechol Modified Carbon Electrodes for Electrocatalysis

of Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide and Ascorbic Acid. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 850–856, 1982.

VARELA, V. P.; COSTA, S. DE S.; RAMOS, M. B. P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) - Leguminosae, Cesalpinoideae. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 35–39, 2005.

VIDAL, L. V. O. et al. The use of eugenol as an anaesthetic for the handling of Pintado juveniles (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 275–279, 2006.

WIKIPÉDIA. Cumarina. **Wikipédia, a enciclopédia livre**, 8 set. 2016. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Cumarina>>. Acesso em: 12/03/2018.

WINK, M. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. **Annual Plant Reviews**, v. 39, p. 2010, 2010.

WU, C. X. et al. Discovery and weed inhibition effects of coumarin as the predominant allelochemical of yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 18, n. 1, p. 168–175, 2016.

YAN, Z. et al. Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 10, 2016.



**PARTE II****ARTIGO I: BEHAVIOR-RESPONSE OF BABÁ DE VERÃO CULTIVAR OF *Lactuca sativa* L. EXPOSED TO DIFFERENT SUBSTRATES FOR LABORATORY BIOASSAYS**

**Autores:** Kamilla Pacheco Govêa, Rafaella Sueko Tomita Pereira, Mateus Donizetti Oliveira de Assis, Pâmela Ingrid Alves, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade & Sandro Barbosa

Artigo redigido conforme as normas da revista **Acta Scientiarum – Agronomy**

**Qualis** 2013/2016 Ciências Ambientais: B1

**JCR** 2016: 0,558

**ARTIGO II: ATIVIDADE ALELOQUÍMICA DE CUMARINAS SINTÉTICAS DERIVADAS DO EUGENOL SOBRE *Lactuca sativa* L.**

**Autores:** Kamilla Pacheco Govêa, Rafaella Sueko Tomita Pereira, Mateus Donizetti Oliveira de Assis, Pâmela Ingrid Alves, Diogo Teixeira Carvalho, Thiago Corrêa de Souza, Luiz Alberto Beijo, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade & Sandro Barbosa

Artigo redigido conforme as normas da revista **Plant Science**

**Qualis** 2013/2016 Ciências Ambientais: Não se aplica

**JCR** 2016: 3,43

**ARTIGO I****BEHAVIOR-RESPONSE OF *Lactuca sativa* L. ‘BABÁ DE VERÃO’ EXPOSED TO  
DIFFERENT SUBSTRATES FOR LABORATORY BIOASSAYS**

Submetido à revista *Acta Scientiarum – Agronomy*



**BEHAVIOR-RESPONSE OF *Lactuca sativa* L. 'BABÁ DE VERÃO' EXPOSED TO DIFFERENT SUBSTRATES FOR LABORATORY BIOASSAYS**

Journal:	<i>Acta Scientiarum. Agronomy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Filter paper, Agar, Vermiculite, Organic substrate, Initial growth

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 BEHAVIOR-RESPONSE OF *Lactuca sativa* L. BABÁ  
8 DE VERÃO EXPOSED TO DIFFERENT  
9 SUBSTRATES FOR LABORATORY BIOASSAYS  
10  
11  
12  
13 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X  
14  
15  
16  
17

18 March 8, 2018  
19

20  
21  
22 COMPORTAMENTO-RESPOSTA DE *Lactuca sativa* L. BABÁ DE VERÃO  
23 EXPOSTA A DIFERENTES SUBSTRATOS PARA BIOENSAIOS  
24 LABORATORIAIS  
25

26  
27 RESPOSTA DA ALFACE A DIFERENTES SUBSTRATOS  
28  
29

30 RESUMO  
31

32  
33 Bioensaios vegetais são empregados para avaliação de efeito biológico de agentes bióticos e  
34 abióticos, e o substrato utilizado deve ser cuidadosamente escolhido. O objetivo deste es-  
35 tado foi elucidar os efeitos de quatro diferentes substratos (papel filtro, ágar, vermiculita e  
36 substrato orgânico) sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. cv. Babá  
37 de verão. Foram utilizadas 30 sementes para cada tratamento, com 3 repetições. Após 7  
38 dias, avaliou-se: porcentagem de germinação (%G) e emergência (%E), Índice de Velocidade  
39 de Germinação (IVG) e Emergência (IVE), número de plântulas (NP), biomassa fresca (BF),  
40 comprimento de raiz (AR) e comprimento de parte aérea (CPA). Papel filtro e ágar foram  
41 igualmente satisfatórios para os parâmetros %G, IVG e NP; idem para vermiculita e sub-  
42 strato orgânico com relação a %E, IVE e NP. Os parâmetros BF, AR e CPA foram maiores  
43 nas plântulas submetidas à vermiculita e menores nas plântulas submetidas ao papel filtro.  
44 Concluiu-se que a vermiculita proporcionou o maior crescimento das plântulas dentre os sub-  
45 stratos testados, entretanto, não permite a avaliação de parâmetros germinativos, apenas de  
46 emergência. Nos casos em que seja indispensável analisar parâmetros germinativos e avaliar  
47 de crescimento das plântulas, o ágar é o substrato mais adequado.  
48  
49  
50

51  
52 **Palavras-chave:** Papel filtro; Ágar; Vermiculita; Substrato orgânico; Crescimento inicial.  
53  
54

55 BEHAVIOR-RESPONSE OF *Lactuca sativa* L. BABÁ DE VERÃO EXPOSED  
56 TO DIFFERENT SUBSTRATES FOR LABORATORY BIOASSAYS  
57  
58

## RESPONSE OF LETTUCE TO DIFFERENT SUBSTRATES

### ABSTRACT

Plant bioassays are used to evaluate the biological effect of biotic and abiotic agents, and the substrate used must be carefully chosen. The objective of this study was to elucidate the effects of four different substrates (filter paper, agar, vermiculite and organic substrate) on the germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. Babá de verão; 30 seeds were used for each treatment, with 3 replicates. After 7 days, the following parameters were evaluated: germination (%G) and emergence (%E) percentage, Germination (GSI) and Emergence (ESI) Speed Index, number of seedlings (NS), fresh biomass (FB), root length (RL) and shoot length (SL). Filter paper and agar were equally satisfactory for %G, GSI and NS; the same was observed for vermiculite and the organic substrate concerning %E, ESI and NS. The parameters FB, RL and SL were higher in the seedlings submitted to vermiculite and lower in the seedlings submitted to filter paper. It is concluded that vermiculite yielded the greatest seedling growth among the tested substrates; however, it does not allow the evaluation of germinative parameters, only emergence. In cases where it is essential to analyze germination parameters and evaluate seedling growth, agar is the most suitable substrate.

**Keywords:** Filter paper; Agar; Vermiculite; Organic substrate; Initial growth.

## 1 INTRODUCTION

In order to evaluate the biological effect of environmental samples, bioactive principles of plants and/or synthetic substances, plant bioassays have been widely used (Iqbal, 2016; Leme & Marin-Morales, 2009; Priac, Badot, & Crini, 2017; Santos et al., 2017; G. L. Silveira, Lima, dos Reis, Palmieri, & Andrade-Vieria, 2017). Several species can be used as target plants of biological activity, and Lettuce and Onion are the most usual, since they have particularities that facilitate their use (Palsikowski et al., 2017; Simões, Madail, Barbosa, & de Lima Nogueira, 2013). Lettuce (*Lactuca sativa* L.) has some advantages in relation to other bioassays, such as high sensitivity, low cost, germination in approximately 24 hours, growth in a wide pH range and low sensitivity to osmotic potentials (Moraes, dos Santos-Filho, Carvalho, de Lima Nogueira, & Barbosa, 2015; Simões et al., 2013; Smiderle, Salibe, Hayashi, & Minami, 2001).

In addition to the target species selected for use, the substrate for the bioassay must be carefully chosen. Among the several types of substrates used for the evaluation of biological effect and/or plant development, it is possible to mention filter paper, agar, vermiculite and organic substrate.

Filter paper is the most used substrate in bioassays for the evaluation of biological effect (Buss & Masek, 2014; Grichi, Nasr, & Khouja, 2016; Haq et al., 2016; Naeem, Ahmed, Kanwal, Murad, & Azizullah, 2015; Souza et al., 2018; Zhang et al., 2015). Its main advantages are the low cost and speed in the evaluation of the bioassay, considering that the seeds are visible and facilitate the analysis of germinative parameters. However, according to Wang

(1993), the use of filter paper has some disadvantages, such as inconveniences to evaluate the biometry of individuals, once the roots can be strongly adhered to the substrate, making it difficult to collect whole roots; horizontal or nonlinear root growth; and interference in the bioavailability of the tested sample, due to the adsorption to the paper.

The use of agar is less common than filter paper for bioassays (Appiah et al., 2015; Cândido et al., 2010). Even though it is little used for this purpose, agar has considerable advantages, such as the formation of a gelatinous consistency that allows root fixation and seedling support, moisture conservation in the container used, since it is properly sealed, and the possibility of keeping substances insoluble in water in suspension, leaving them bioavailable for seedling absorption. A negative point to its use would be the high risk of contamination (Abreu, Nogueira, & de Souza Medeiros, 2005).

Vermiculite is a clay-mineral consisting of hydrated silicates of aluminum, magnesium and iron that is widely used as a substrate in many research areas and has high cation exchange capacity (Abollino, Giacomino, Malandrino, & Mentasti, 2008; Malandrino, Abollino, Giacomino, Aceto, & Mentasti, 2006). It is a readily available substrate, with low density, uniformity in its chemical and granulometric composition, high porosity and considerable water retention capacity (Martins, ao Alves Bovi, & Spiering, 2009), besides being microbiologically inert, which eliminates possible interferences in responses of target plants. A considerable disadvantage of vermiculite in bioassays lies precisely in its high cation exchange capacity, which can lead to the adsorption of compounds in the substrate particles, making them unavailable for plant absorption (Quartarone, Neves, & Caldas, 2014; Tito, Chaves, & Guerra, 2012).

Organic substrates can be understood as the medium that simulates the soil in which plants develop, but they differ from it, since they have been removed from their places of origin and are artificially produced or enriched (Menezes-Júnior, Fernandes, Mauch, & ao Baptista da Silva, 2000). The main advantage of the use of organic substrates in bioassays is their approximation with soil characteristics, which allows to elucidate the possible interactions that occur in natural environments. On the other hand, the same characteristic can be considered negative if it is necessary to eliminate possible interferences of the soil microbiota on the biological effect of samples. It is important to note that vermiculite and organic substrate do not allow the analysis of germination parameters, only emergence, since it is only possible to verify the germinated seeds that emerge on the surface of the substrate.

Substrates have a direct influence on bioassays, and their physical and chemical characteristics are directly related to the initial growth of target plants, such as aeration, water retention capacity, degree of pathogen infestation, among others (Silva, Simões, & da Silva, 2012; Varela, de Souza Costa, & Ramos, 2005). In view of the above, the objective of this study was to elucidate the effects of different substrates on the germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. Babá de verão.

## 2 MATERIAL AND METHODS

*Lactuca sativa* L. Babá de verão (ISLA, lot 40112-S2) seeds were used, since they

were the most suitable genotype for this type of experiment, according to Santos et al. (2017). For the bioassay, 30 seeds were used in: Petri dish (diameter: 7 cm) with two sheets of filter paper (Whatman n° 2) and 3 mL distilled water; Petri dish (diameter: 7 cm) with 10 mL agar (6 g.L<sup>-1</sup>); Gerbox containing half its volume (200 mL) of vermiculite with distilled water; and Gerbox containing half of its volume (200 mL) of Mococa® (organic substrate containing peat, pine dust and charcoal, enriched with macro-and micronutrients) with distilled water. For each treatment, 3 replicates were used.

The treatments were maintained in a B.O.D. chamber for 7 days, at 24°C and 12-hour photoperiod. The following pre- and post-emergence parameters were analyzed: germination (%G) and emergence (%E) percentage, germination (GSI) and emergence (ESI) speed index; germination parameters were used for Petri dishes and emergence parameters were used for Gerbox. %G and %E were obtained 24 hours after the beginning of the experiment and on the 7th day. Seeds that had radicle protrusion were considered germinated, and those considered emerged were visibly exposed to the substrate surface. Number of seedlings (NS), fresh biomass (FB), root length (RL) and shoot length (SL) were also evaluated.

GSI and ESI were determined according to the formulas (Maguire, 1962):

$$GSI\text{or}ESI = \frac{N1}{1} + \frac{N2}{2} + \frac{N3}{3} + \dots + \frac{Nn}{n}$$

where, N1, N2, N3, Nn, correspond to the number of germinated seeds or seedlings emerged in the first, second, third, to the seventh evaluation, respectively; n is the evaluation number.

FB, NS, RL and SL data were collected on the 7th day after the beginning of the experiment; all the plant material in each bioassay was weighed in an analytical balance, and the germinated plant material that developed root and shoot was considered as seedlings. For the evaluation of RL and SL, 10 visibly larger seedlings of each treatment were selected, as described by Santos et al. (2017). Measurements were performed using a digital caliper (DIGIMESS® 150 mm). The experimental design was completely randomized (CRD) and data were submitted to analysis of variance (ANOVA); the means were compared using the Scott-Knott test at 5% significance.

### 3 RESULTS

Germination (%G) and emergence (%E) percentages had the same behavior at 24 hours and on the 7th day of experiment, in which the substrates filter paper and agar did not differ (Table 1). The same can be observed for vermiculite and the organic substrate.

For germination (GSI) and emergency (ESI) speed index, seedlings exposed to the filter paper and agar did not differ among themselves, as did vermiculite and the organic substrate (Figure 1a).

Table 1: Germination (%G) and emergence (%E) percentages means obtained for bioassays in Petri dishes and Gerbox, respectively, at 24 hours and on the 7th day of experiment  $\pm$  standard error. Values followed by the same letter in the column do not differ by the Scott-Knott test at 5% significance.

Bioassay	%G 24h	%E 24h	%G 7th day	%E 7th day
Filter paper (Petri dish)	75.55 $\pm$ 6.18 a		97.77 $\pm$ 1.11 a	
Agar (Petri dish)	74.44 $\pm$ 4.84 a		95.55 $\pm$ 2.93 a	
Vermiculite (Gerbox)		15.55 $\pm$ 10.59 a		77.77 $\pm$ 8.67 a
Organic substrate (Gerbox)		17.77 $\pm$ 5.87 a		73.33 $\pm$ 5.09 a

Filter paper and agar had a higher number of seedlings (NS) than vermiculite and the organic substrate, but there was no significant statistical difference between filter paper and agar and between vermiculite and the organic substrate (Figure 1b).

For fresh biomass (FB), there was a significant statistical difference among all the treatments. The highest FB was observed in the treatment with vermiculite. In decreasing order, agar, organic substrate and filter paper (Figure 1c).

Root length (RL) showed higher values in seedlings developed in vermiculite. Intermediate values can be observed in seedlings grown on agar and organic substrate, which did not differ from each other. The lowest RL value observed belongs to the seedlings developed in filter paper (Figure 1d). Regarding shoot length (SL), all treatments differed statistically from each other. Seedlings grown on vermiculite, organic substrate, agar and filter paper (Figure 1d) are in descending order.

## 4 DISCUSSION

The results obtained for filter paper show that, although it is advantageous to evaluate germinative aspects (%G and GSI) and NS, it does not allow great development, since it presented the lowest values for the parameters FB, RL and SL. The seeds germinate and develop root and shoot, but the seedlings have a reduced size in relation to the other substrates tested. This may be justified by the fact that filter paper does not provide depth for root development nor nutrients. As the root is responsible for the uptake of water and nutrients to plants, the smaller it is, the less contact surface there will be for this organ to perform its function, which negatively influences seedling growth and development (Andrade, Bittencourt, & Vestena, 2009; Gusman, Bittencourt, & Vestena, 2008; Moraes et al., 2015; Novaes, Torres, & dos Santos, 2016).

Agar was also satisfactory for the evaluation of %G, GSI and NS, compared to filter paper. However, in contrast to the low development observed in the seedlings that grew on filter paper, agar provided better conditions for seedling growth, allowing a high value for FB, which was only lower than vermiculite. FB is a parameter commonly used in the evaluation of biological effect (Javaid, Shafique, Bajwa, & Shafique, 2006; Moraes et al., 2015; Nunes, de Melo, Nobrega, Loures, & Sosa, 2014), since it provides efficiency in water uptake by plants. In addition, the values of RL and SL were higher in seedlings exposed to agar, compared



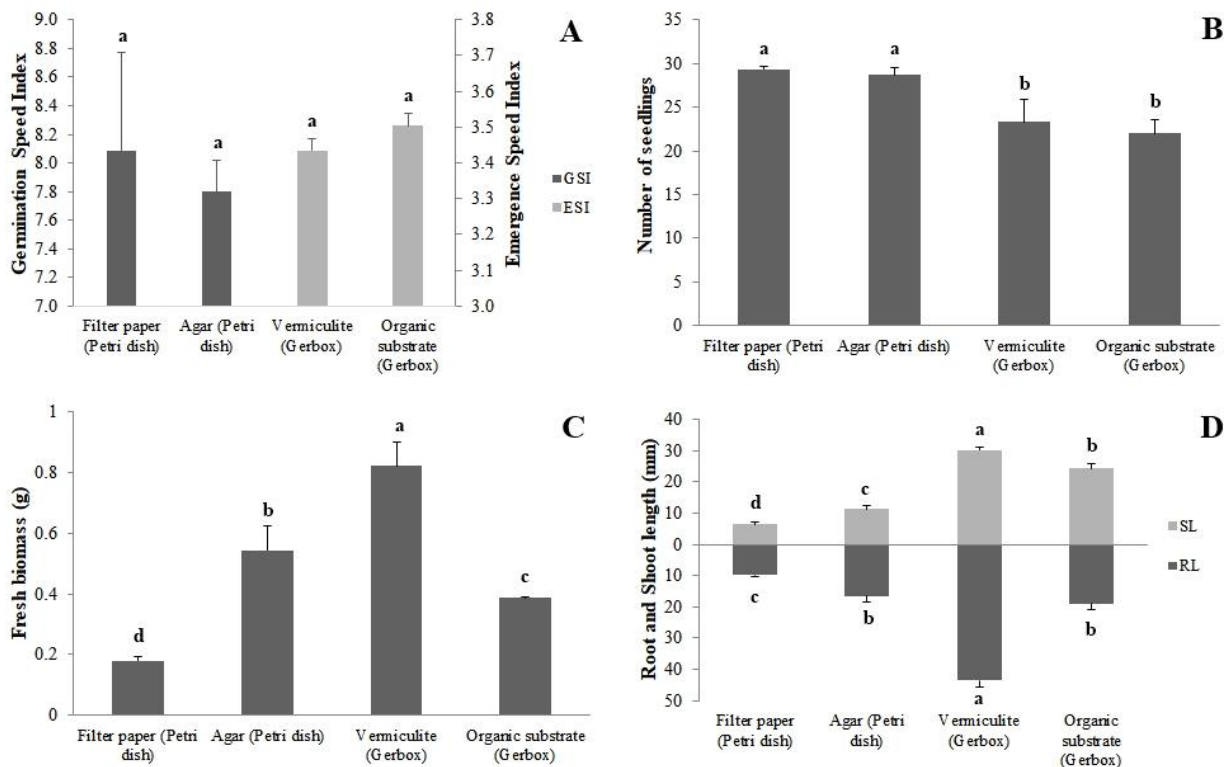


Figure 1: A. Germination Speed Index (GSI) and Emergence Speed Index (ESI) means, obtained for bioassays in Petri dishes and Gerbox, respectively B. Number of seedlings (NS) means grown in different bioassays. C. Fresh biomass (FB) means of seedlings grown in different bioassays. D. Root length (RL) and shoot length (SL) means of seedlings grown in different bioassays. Columns with the same color followed by the same letter do not differ by the Scott-Knott test at 5% significance. Bar: Standard error.

to those exposed to filter paper, once agar provides depth for root growth and consequent seedling development. The increase in these parameters is related to the water availability provided by agar to the plants, which corroborates Coutinho, Machado, Vieira, Guimarães, and Ferreira (2001), who correlate the increase in FB to the greater development of RL and SL.

Vermiculite and the organic substrate are also satisfactory for the evaluation of emergence parameters (%E and ESI) and NS. However, vermiculite has advantages over all other substrates in terms of initial growth, with the highest values for FB, RL and SL. This is related to its water retention capacity and the consequent water availability to the plants, besides providing support for root development, since it is uniform in the granulometric composition and allows greater seedling growth, due to the homogeneous chemical composition (Martins et al., 2009; de Oliveira Ugarte, ao Alves Sampaio, & França, 2008). As in the seedlings exposed to agar, the highest values of RL and SL directly influence the highest

1  
2  
3 value observed for FB.

4  
5 149 The organic substrate, in turn, had a low value with respect to the FB, and was only  
6 150 higher than filter paper. In contrast, it presented RL similar to agar and SL intermediate  
7 151 between agar and vermiculite. Costa, Ramos, Sampaio, Guilherme, & Fernandes (2007) and  
8 152 Silveira, Rodrigues, Gomes, Mariano, & Mesquita (2002) correlate the growth of tomato  
9 153 seedlings with the physical and chemical characteristics of the substrates used, and those  
10 154 with higher availability of water and nutrients are responsible for the highest values of the  
11 155 tested parameters. Based on this fact, the results obtained for the organic substrate show  
12 156 that, although it provides good support to root development and has nutrients that support  
13 157 seedling growth which justifies the values obtained for RL and SL, it is not a substrate that  
14 158 has water retention capacity as satisfactory as agar and vermiculite, which explains the lower  
15 159 value of FB, compared to them.

16  
17  
18 160 It should be taken into account that the statistical difference observed in NS could  
19 161 have occurred due to the fact that not all the seedlings emerged visually on the surface  
20 162 of vermiculite and the organic substrate during the 7 days of experiment, demonstrating  
21 163 that it is more advantageous to evaluate this parameter on filter paper or on agar for short  
22 164 experiments, which is congruent to Nunes et al. (2014). For experiments that require longer  
23 165 time intervals, NS can be applied using vermiculite or organic substrate, since the seedlings  
24 166 will have more time to emerge, as occurred with the experiment developed by John et al.  
25 167 (2010).

## 29 168 5 CONCLUSION

30  
31  
32 169  
33 170 It is concluded that vermiculite yielded the highest seedling growth, which is verified  
34 171 by the higher values of FB, RL and SL. However, it is a substrate that does not allow  
35 172 the evaluation of germinative parameters, only emergence. In cases where the analysis of  
36 173 germination parameters is indispensable, agar is the most suitable substrate, since it allows  
37 174 considerable seedling growth.

## 41 175 6 ACKNOWLEDGMENT

42  
43 176  
44 177 This study was financially supported by FAPEMIG (APQ-02123-14); CAPES and  
45 178 CNPq (research scholarships).  
46 179

## 50 180 References

51  
52 181 Abollino, O., Giacomino, A., Malandrino, M., & Mentasti, E. (2008). Interaction of  
53 182 metal ions with montmorillonite and vermiculite. *Applied Clay Science*, 38(3),  
54 183 227–236. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131707000750> doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.04.002>  
55 184  
56 185

- 185 Abreu, D. C. A., Nogueira, A. C., & de Souza Medeiros, A. C. (2005, 06). Efeito do  
186 substrato e da temperatura na germinação de sementes de cataia (*Drimys brasiliensis*  
187 miers. winteraceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 27(1), 149–157.
- 188 Andrade, H. M., Bittencourt, A. H. C., & Vestena, S. (2009). Potencial alelopático de *Cyperus*  
189 *rotundus* L. sobre espécies cultivadas. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 1984–1990. Re-  
190 trieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000700049&nrm=iso)  
191 [-70542009000700049&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000700049&nrm=iso)
- 192 Appiah, K., Li, Z., sen Zeng, R., Luo, S., Oikawa, Y., & Fujii, Y. (2015). Determination  
193 of allelopathic potentials in plant species in sino-japanese floristic region by sandwich  
194 method and dish pack method. *International Journal of Basic and Applied Sciences*,  
195 4(4), 381–394. Retrieved from [https://www.sciencepubco.com/index.php/ijbas/](https://www.sciencepubco.com/index.php/ijbas/article/view/5147)  
196 [article/view/5147](https://www.sciencepubco.com/index.php/ijbas/article/view/5147) doi: 10.14419/ijbas.v4i4.5147
- 197 Buss, W., & Masek, O. (2014). Mobile organic compounds in biochar – a potential source  
198 of contamination – phytotoxic effects on cress seed (*Lepidium sativum*) germination.  
199 *Journal of Environmental Management*, 137, 111–119. Retrieved from [http://www](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714000747)  
200 [.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714000747](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714000747) doi: [https://doi](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.045)  
201 [.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.045](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.045)
- 202 Cândido, A. C. S., Dias, A. C. R., Serra, A. P., Christoffoleti, P. J., de Paula Quinto Scalon,  
203 S., & Pereira, M. T. L. (2010). Allelopathic potential from leaves of weeds by sandwich  
204 method. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(3), 268–272.
- 205 Costa, C. A., Ramos, S. J., Sampaio, R. A., Guilherme, D. O., & Fernandes, L. A. (2007). Co-  
206 conut fiber and cotton waste as substrate for tomato seedlings. *Horticultura Brasileira*,  
207 25(3), 387–391.
- 208 Coutinho, W. M., Machado, J. C., aes Carvalho Vieira, M. G. G., aes, R. M. G., & Ferreira,  
209 D. F. (2001). Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de  
210 sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. *Revista*  
211 *Brasileira de Sementes*, 23(2), 127–135.
- 212 de Oliveira Ugarte, J. F., ao Alves Sampaio, J., & França, S. C. A. (2008). Vermiculita.  
213 CETEM/MCTI.
- 214 Grichi, A., Nasr, Z., & Khouja, M. L. (2016). Phytotoxic effects of essential oil from  
215 *Eucalyptus lehmannii* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Bulletin of*  
216 *Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 5(4), 17–23.
- 217 Gusman, G. S., Bittencourt, A. H. C., & Vestena, S. (2008). Allelopathy of *Baccharis*  
218 *dracunculifolia* dc. on the germination and development of cultivated species. *Acta*  
219 *Scientiarum Biological Science*, 30(2), 119–125.
- 220 Haq, I., Kumari, V., Kumar, S., Raj, A., Lohani, M., & Bhargava, R. N. (2016). Evaluation  
221 of the phytotoxic and genotoxic potential of pulp and paper mill effluent using *Vigna*  
222 *radiata* and *Allium cepa*. *Advances in Biology*, 2016.
- 223 Iqbal, M. (2016). *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: a review.  
224 *Chemosphere*, 144, 785–802.
- 225 Javaid, A., Shafique, S., Bajwa, R., & Shafique, S. (2006). Effect of aqueous extracts of  
226 allelopathic crops on germination and growth of *Parthenium hysterophorus* L. *South*  
227 *African Journal of Botany*, 72(4), 609–612.
- 228 John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Satinder K. Brar, K., Pouleur, S., & Surampalli,  
229 R. Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium*

- 230 *oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of  
231 soybean. *Crop Protection*, 29(12), 1452–1459.
- 232 Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring:  
233 a review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1),  
234 71–81.
- 235 Maguire, J. D. (1962). Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling  
236 emergence and vigor. *Crop science*, 2(2), 176–177.
- 237 Malandrino, M., Abollino, O., Giacomino, A., Aceto, M., & Mentasti, E. (2006). Adsorption  
238 of heavy metals on vermiculite: influence of ph and organic ligands. *Journal of Colloid  
239 and Interface Science*, 299(2), 537–546.
- 240 Martins, C. C., ao Alves Bovi, M. L., & Spiering, S. H. (2009). Substrate moisture level  
241 effect on seedling emergency and vigor of peach palm. *Revista Brasileira de Fruticultura*,  
242 31(1), 224–230.
- 243 Menezes-Júnior, F. O. G., Fernandes, H. S., Mauch, C. R., & ao Baptista da Silva, J. (2000).  
244 Characterization and performance of different substrates for lettuce plug-type trans-  
245 plants production under protected environment. *Horticultura Brasileira*, 18(3), 164–  
246 170.
- 247 Moraes, R. M., dos Santos-Filho, P. R., Carvalho, M., de Lima Nogueira, M., & Barbosa, S.  
248 (2015). Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* l.  
249 *Revista Brasileira de Biociências*, 13(2), 115–121.
- 250 Naeem, F., Ahmed, F., Kanwal, M., Murad, W., & Azizullah, A. (2015). Phytotoxicity  
251 evaluation of some commonly used shampoos using *Brassica napus* l. *Environmental  
252 Science and Pollution Research*, 22(19), 15164–15170.
- 253 Novaes, P., Torres, P. B., & dos Santos, D. Y. A. C. (2016). Biological activities of annonaceae  
254 species extracts from cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1), 131–137.
- 255 Nunes, J. V. D., de Melo, D., Nobrega, L. H. P., Loures, N. T. P., & Sosa, D. E. F. (2014).  
256 Allelopathic activity of cover crops extracts on soybean, cucumber and lettuce. *Revista  
257 Caatinga*, 27(1), 122–130.
- 258 Palsikowski, P. A., Roberto, M. M., Sommaggio, L. R. D., Souza, P. M. S., Morales, A. R.,  
259 & Marin-Morales, M. A. (2017). Ecotoxicity evaluation of the biodegradable polymers  
260 pla, pbat and its blends using *Allium cepa* as test organism. *Journal of Polymers and  
261 the Environment*, 1–8.
- 262 Priac, A., Badot, P.-M., & Crini, G. (2017). Treated wastewater phytotoxicity assessment us-  
263 ing *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. *Comptes  
264 Rendus Biologies*, 340(3), 188–194.
- 265 Quartarone, P., Neves, M. A. F. S., & Caldas, L. F. S. (2014). Estudo da vermiculita como  
266 adsorvente de íons cobre (ii) em solução aquosa. *Revista Eletrônica Perspectivas da  
267 Ciência e Tecnologia*, 4(1-2), 2–11.
- 268 Santos, S. C., de Oliveira, U. A., de Oliveira Ribeiro Trindade, L., de Assis, M. D. O.,  
269 Campos, J. M. S., Salgado, E. G., & Barbosa, S. (2017). Genotypes selection for plant  
270 bioassays using *Lactuca sativa* l. and *Allium cepa* l. *Pakistan Journal of Botany*, 49(6),  
271 2201–2212.
- 272 Silva, R. B. G., Simões, D., & da Silva, M. R. (2012). Quality of *Eucalyptus urophylla* x *E.  
273 grandis* cuttings as a function of substrate. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola  
274 e Ambiental*, 16(3), 297–302.

- 1  
2  
3  
4 275 Silveira, E. B., Rodrigues, V. J. L. B., Gomes, A., Mariano, R. L. R., & Mesquita, J. C. P.  
5 276 (2002). Coconut coir fiber as a potting media for tomato seedling production. *Horti-*  
6 277 *cultura Brasileira*, 20(2), 211–216.
- 7 278 Silveira, G. L., Lima, M. G. F., dos Reis, G. B., Palmieri, M. J., & Andrade-Vieria, L. F.  
8 279 (2017). Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using  
9 280 *Allium cepa* l. and *Lactuca sativa* l. *Chemosphere*, 178, 359–367.
- 10 281 Simões, M. S., Madail, R. H., Barbosa, S., & de Lima Nogueira, M. (2013). Bioassay stan-  
11 282 dardization for the detection of allelopathic compounds and environmental toxicants  
12 283 using lettuce. *Biotemas*, 26(3), 29–36.
- 13 284 Smiderle, O. J., Salibe, A. B., Hayashi, A. H., & Minami, K. (2001). Production of lettuce,  
14 285 cucumber and sweet pepper seedlings in substrate with different combinations of sand,  
15 286 soil and plantmax®. *Horticultura Brasileira*, 19(3), 386–390.
- 16 287 Souza, G. G., Pinheiro, A. L. M., Silva, J. A., Veroneze-Júnior, V., Carvalho, M., Bertoli,  
17 288 A. C., ... de Souza, T. C. (2018). Morpho-physiological tolerance mechanisms of  
18 289 *Talinum patens* to lead. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(1), 4.
- 19 290 Tito, G. A., Chaves, L. H. G., & Guerra, H. O. C. (2012). Zinc and copper mobility in  
20 291 argisol with application of bentonite clay. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e*  
21 292 *Ambiental*, 16(9), 938–945.
- 22 293 Varela, V. P., de Souza Costa, S., & Ramos, M. B. P. (2005). Influence of temperature  
23 294 and substrate on seeds germination of itaubarana (*Acosmium nitens* (vog.) yakovlev)-  
24 295 leguminosae, caesalpinoideae. *Acta Amazonica*, 35(1), 35–39.
- 25 296 Wang, W. (1993). Comparative rice seed toxicity tests using filter paper, growth pouch-tm,  
26 297 and seed tray methods. *Environmental Monitoring and Assessment*, 24(3), 257–265.
- 27 298 Zhang, R., Zhang, H., Tu, C., Hu, X., Li, L., Luo, Y., & Christie, P. (2015). Phytotoxicity of  
28 299 zno nanoparticles and the released zn (ii) ion to corn (*Zea mays* l.) and cucumber (*Cu-*  
29 300 *cumis sativus* l.) during germination. *Environmental Science and Pollution Research*,  
30 301 22(14), 11109–11117.

## ARTIGO II

### ATIVIDADE ALELOQUÍMICA DE CUMARINAS SINTÉTICAS DERIVADAS DO EUGENOL SOBRE *Lactuca sativa* L.

#### RESUMO

Cumarinas são capazes de promover efeitos nocivos sobre plantas, o que permite que sejam exploradas como herbicidas menos agressivos ao meio ambiente. Os derivados cumarínicos utilizados neste estudo ainda não foram testados em modelos vegetais, sendo inédito seu efeito sobre plantas. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação fitotóxica de seis cumarinas sintéticas em bioensaio com *Lactuca sativa* L., no intuito de selecionar a molécula mais responsiva, cuja toxicidade foi melhor elucidada pelos estudos do complemento cromossômico e do metabolismo antioxidante enzimático do bioteste. Os ensaios de fitotoxicidade, visando o ranqueamento dos derivados cumarínicos, demonstraram que a cumarina A1 foi a mais responsiva, causando redução dos parâmetros: número de plântulas normais, biomassa fresca, comprimento de raiz e comprimento de parte aérea. Os estudos subsequentes realizados demonstraram que esta molécula é citogenotóxica, devido aos danos causados no ciclo celular e à ocorrência de anormalidades cromossômicas, destacando-se efeito aneugênico. Porém, não interferiu na atividade das enzimas antioxidantes e não provocou peroxidação lipídica. As alterações causadas pela cumarina A1 aqui descritas podem subsidiar a compreensão da ação aleloquímica das cumarinas e o seu potencial uso na produção de herbicidas naturais.

**Palavras-chave:** Alface; Fitotoxicidade; Citogenotoxicidade; Enzimas antioxidantes; Peroxidação lipídica.

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, muitas espécies invasoras têm demonstrado resistência aos herbicidas disponíveis comercialmente, e por isso, há um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de processos que sejam baseados em produtos alternativos para controlar essas plantas, objetivando minimizar os impactos ambientais causados por sua utilização indiscriminada [1–3].

Dentro deste contexto, as cumarinas se apresentam como um grande grupo de metabólitos secundários derivados de compostos fenólicos, produzidos principalmente por plantas superiores, podendo ser encontrados também em fungos e bactérias [4]. Há relatos sobre bioatividades dessas substâncias indicando o potencial para serem exploradas como alternativa aos herbicidas comerciais, pela inibição da germinação, do crescimento e desenvolvimento inicial, bem como pelo bloqueio da mitose de inúmeros biotestes [5–7].

Além das cumarinas encontradas no metabolismo secundário vegetal, elas podem ser isoladas quimicamente das espécies vegetais que as produzem ou serem sintetizadas em laboratório, tendo vários representantes sintéticos e seus respectivos efeitos relatados na literatura [8–11]. Neste estudo, as cumarinas utilizadas são sintéticas e derivadas do eugenol, um composto fenólico proveniente do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais. O eugenol também pode ser quimicamente isolado ou sintetizado, além de ter sua estrutura química modificada em laboratório, servindo como um importante precursor para outras formas químicas de eugenol e outras substâncias [12–14].

Estudos de parâmetros germinativos e do crescimento inicial de plântulas permitem verificar o efeito biológico de substâncias, dentre elas as cumarinas, no intuito de elucidar possíveis efeitos fitotóxicos observados na morfofisiologia de espécies vegetais [6,15–17]. Correlacionar estes estudos de fitotoxicidade com alterações no ciclo celular e comportamento do complemento cromossômico permite uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação das cumarinas, possibilitando verificar também a citogenotoxicidade como efeito biológico dessas substâncias [18,19]. Ainda neste sentido, estudar a atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) permite inferir a ocorrência de possíveis estresses oxidativos nas plântulas expostas a cumarinas e seus derivados. Estas análises podem ser correlacionadas à peroxidação lipídica, ampliando o espectro de compreensão dos mecanismos de estresse.



Há poucos trabalhos na literatura que correlacionam os principais efeitos das cumarinas sobre o crescimento inicial de plantas com os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas, genéticas e do metabolismo antioxidante [20,21]. Nesse sentido, torna-se necessário determinar o efeito biológico sobre biotestes vegetais a fim de subsidiar estudos para a possível utilização dessas substâncias como uma alternativa ecologicamente viável em relação aos herbicidas comerciais. Além disso, as seis cumarinas sintéticas derivadas do eugenol utilizadas neste trabalho ainda não foram testadas em modelos vegetais, indicando o vanguardismo desta pesquisa.

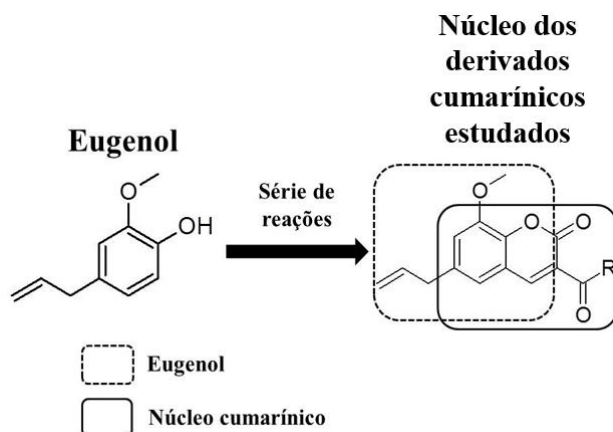
Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação fitotóxica de seis cumarinas sintéticas em bioensaio com *Lactuca sativa* L., no intuito de eleger a molécula mais responsiva, cuja toxicidade foi melhor elucidada pelos estudos do complemento cromossômico e do metabolismo antioxidante enzimático do bioteste.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Caracterização das cumarinas sintéticas

Os seis derivados cumarínicos utilizados neste estudo foram sintetizados a partir da molécula de eugenol, mantendo-se a sua cadeia insaturada (Figura 1). O eugenol foi, portanto, um protótipo a partir do qual foi gerada uma estrutura química comum a todas as cumarinas aqui tratadas (núcleo cumarínico), as quais se diferenciavam em estrutura umas das outras por farmacóforos distintos em seus radicais. Os seis derivados cumarínicos sintéticos foram testados pela primeira vez em bioensaios vegetais neste trabalho, e foram denominadas de A1, A2, A3, A4, A5 e A6.





**Figura 1.** Estrutura química das cumarinas sintéticas derivadas do eugenol.

## 2.2. Ensaio de fitotoxicidade

Ensaio preliminares demonstraram a necessidade da utilização de uma substância que auxiliasse na dispersão das cumarinas no ágar, o que foi solucionado pela aplicação de Tween 80, cuja concentração estipulada (8%) não interfere no metabolismo do bioteste.

Cada cumarina foi suspensa em uma solução de ágar (7 g.L<sup>-1</sup>) contendo 8% de Tween 80 para se obter a solução estoque de concentração 800 µg.mL<sup>-1</sup>. O pH foi aferido e ajustado para 5,8 a fim garantir a solidificação do ágar [22].

Para o ensaio de fitotoxicidade, foram utilizadas 30 sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Babá de verão em Placas de Petri (7 cm de diâmetro) contendo 10 mL da solução de ágar (7 g.L<sup>-1</sup>) + 8% de Tween 80 nas diferentes concentrações de cumarinas: 50, 100, 200, 400 e 800 µg.mL<sup>-1</sup>, e ágar + 8% de Tween 80 como controle negativo. Para cada tratamento, foram utilizadas 3 repetições.

Os tratamentos foram acondicionados em câmara tipo B.O.D., a 24°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de germinação (%G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), número de plântulas totais (NP), número de plântulas normais (NPN), biomassa fresca (BF), comprimento de raiz (AR) e comprimento de parte aérea (CPA) no 7º dia após o início do experimento.

A determinação do IVG foi feita conforme a fórmula proposta por Chiapusio et al. [23]:

$$IVG = \frac{N_1}{1} + \frac{(N_2 - N_1)}{2} + \frac{(N_3 - N_2)}{3} + \dots + \frac{(N_n - N_{n-1})}{n}$$

em que  $N_1, N_2, N_3, N_n, N_{n-1}$  correspondem ao número de sementes germinadas na primeira, segunda, terceira, n, n-1 avaliações, respectivamente; e  $n$  à avaliação.

Para análise de NP e NPN, foram consideradas como plântulas o material vegetal germinado que desenvolveu raiz e parte aérea, e como plântulas normais, aquelas semelhantes ao controle que não apresentaram características visuais de efeito tóxico. Para análise dos parâmetros AR e CPA foram escolhidas as 10 maiores plântulas de cada placa, sendo as medidas realizadas com auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS® 150 mm).

A partir dos resultados obtidos, foi selecionada a molécula mais responsiva, ou seja, que causou maior efeito tóxico. Os experimentos subsequentes foram realizados com a cumarina selecionada.

### 2.3. Ensaio de citogenotoxicidade

Para as avaliações citogenotóxicas, sementes de *L. sativa* foram colocadas nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. As pontas de raiz foram coletadas 24 horas após o início do experimento, fixadas em Carnoy (3 etanol absoluto : 1 ácido acético glacial) e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

As preparações citológicas foram confeccionadas pelo método descrito por Ribeiro et al. [24]. Foram avaliadas 6000 células por tratamento para determinação do índice mitótico (IM) e verificação da ocorrência de anormalidades cromossômicas (AC).

### 2.4. Ensaio da atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

Para o ensaio das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, 50 sementes de *L. sativa* foram colocadas nas mesmas condições experimentais descritas para os ensaios anteriores durante 10 dias, com intuito de acumular a biomassa necessária para extração.

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de plântulas inteiras foram macerados em  $\text{N}_2$  líquido com 10 mg de PVPP e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 400 mM, 15  $\mu\text{L}$  de EDTA 10 mM e 75  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 200 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 rpm, por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), quantificadas em leituras

em espectrofotômetro (Biochron, Libra S22). O volume final de reação para leitura das enzimas foi de 2 mL, em cubeta de vidro. Todas as leituras foram realizadas em duplicatas.

A quantificação da atividade da SOD foi realizada de acordo com o método proposto por Giannopolitis e Ries [25], a 560nm, e uma unidade de atividade da SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a fotorredução do NBT. Para quantificar a atividade da CAT, foi utilizado método de Havir e McHale [26], a 240 nm, de 15 em 15 segundos durante 3 minutos, e uma unidade de atividade da CAT é definida como a quantidade de enzima que catalisa a decomposição de  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A atividade da APX foi quantificada de acordo com método de Nakano e Asada [27], a 290 nm, de 15 em 15 segundos durante 3 minutos, e uma unidade de atividade da APX é definida como a quantidade de enzima que oxida  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de ascorbato.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust [28], a 540 nm.

## 2.5. Análises estatísticas

Para o experimento de fitotoxicidade, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com fatorial  $6 \times 6$  (6 cumarinas e 6 concentrações), e 3 repetições. Para os demais experimentos, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com 6 concentrações e 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa R.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Ensaio de fitotoxicidade

A análise realizada no sétimo dia demonstrou que todos os tratamentos alcançaram porcentagem de germinação (%G) semelhante, exceto os expostos à cumarina A1 na concentração  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que foi menor do que todas as demais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Médias obtidas para porcentagem de germinação (%G) de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às seis cumarinas sintéticas.

Cumarina	Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	0	50	100	200	400	800
A1	94,44% a	91,11% a	88,89% a	92,22% a	86,66% a	71,11% b
A2	90,00% a	91,11% a	88,89% a	93,33% a	97,78% a	91,11% a
A3	94,44% a	96,67% a	95,55% a	95,55% a	92,22% a	96,67% a
A4	94,44% a	84,44% a	95,55% a	93,33% a	88,89% a	93,33% a
A5	94,44% a	94,44% a	94,44% a	92,22% a	91,11% a	94,44% a
A6	96,67% a	93,33% a	93,33% a	90,00% a	91,11% a	87,77% a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

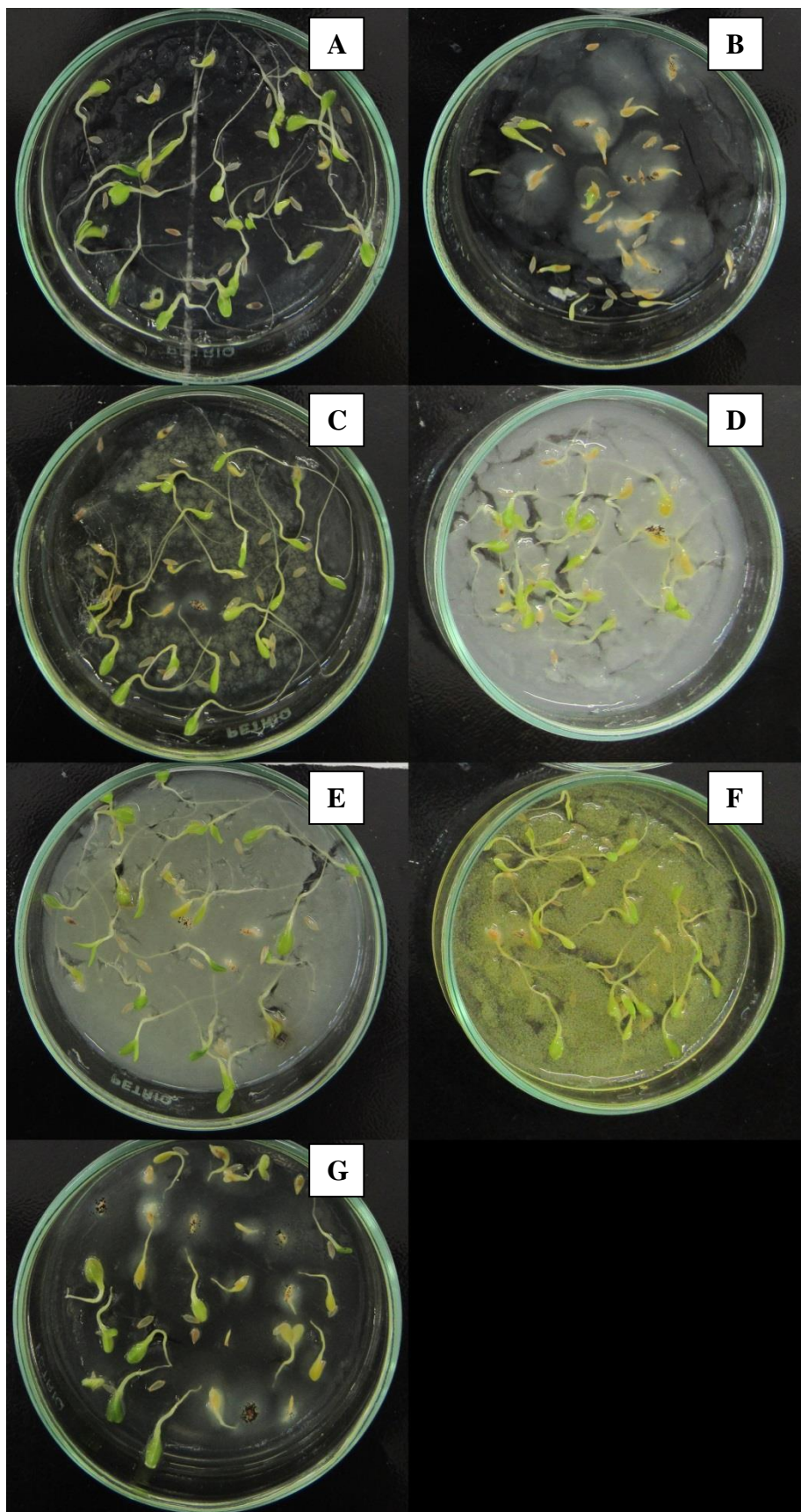
Os dados para os parâmetros Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e número de plântulas (NP) não são apresentados, pois a análise estatística demonstrou interação não significativa para ambos ( $p = 0,084$  e  $p = 0,078$ , respectivamente), ou seja, as médias para IVG e NP não diferiram entre si em nenhum dos tratamentos.

Com relação ao número de plântulas normais (NPN), com exceção do controle, houve diferença estatística entre as cumarinas em todas as concentrações, sendo que o tratamento com a cumarina A1, em maiores concentrações, foi o que obteve o menor NPN (Tabela 2). Foi possível observar anormalidades no sistema radicular, em que as raízes primárias estavam atrofiadas e/ou escurecidas (Figura 2).

**Tabela 2.** Médias obtidas para número de plântulas normais (NPN) de *Lactuca sativa* expostas às seis cumarinas sintéticas.

Cumarinas	Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	0	50	100	200	400	800
A1	24,66 a	22,66 a	14,33 b	18,50 b	7,00 b	0,00 d
A2	24,50 a	24,00 a	25,00 a	25,50 a	24,00 a	15,33 b
A3	25,50 a	24,66 a	24,50 a	25,50 a	25,00 a	7,50 c
A4	24,33 a	19,00 b	24,00 a	25,33 a	24,50 a	18,66 b
A5	21,66 a	16,33 b	22,00 a	21,66 a	23,00 a	23,00 a
A6	22,66 a	22,33 a	25,50 a	15,00 b	22,00 a	1,33 d

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 2.** Plântulas de *Lactuca sativa* expostas às seis cumarinas sintéticas na concentração  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , no 7º dia após o início do experimento. **A.** Controle. **B.** A1. **C.** A2. **D.** A3. **E.** A4. **F.** A5. **G.** A6.

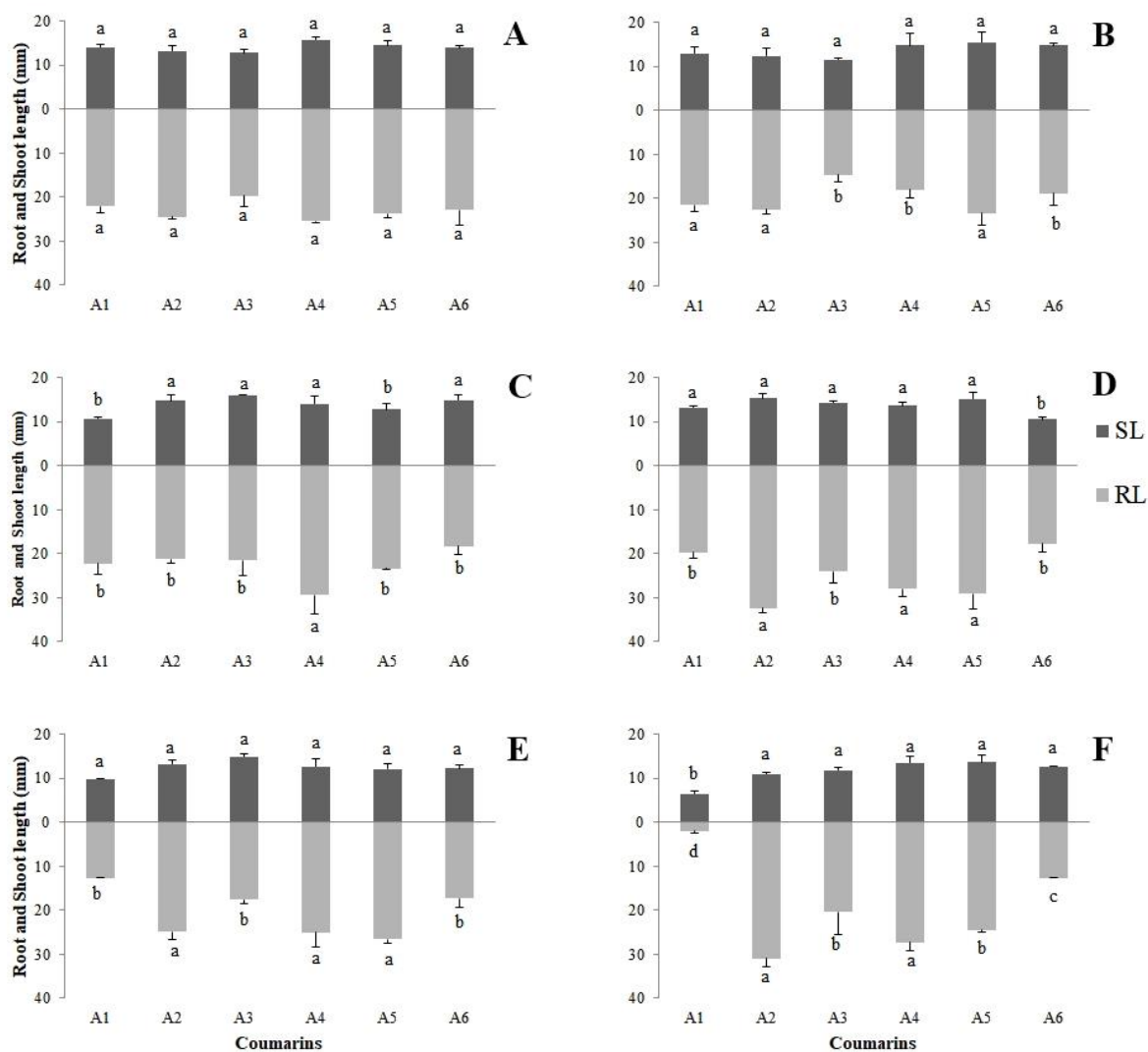
Para os dados de biomassa fresca (BF), com exceção da concentração 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , todos os tratamentos apresentaram diferença estatística entre as cumarinas, sendo que, em maiores concentrações, a cumarina A1 foi a que obteve a menor BF (Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias obtidas para biomassa fresca (BF), em gramas, de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às seis cumarinas sintéticas.

Cumarinas	Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	0	50	100	200	400	800
<b>A1</b>	0,42 a	0,27 a	0,18 c	0,18 c	0,15 d	0,14 c
<b>A2</b>	0,29 b	0,36 a	0,39 a	0,44 a	0,45 a	0,21 b
<b>A3</b>	0,25 b	0,25 a	0,46 a	0,33 b	0,37 b	0,38 a
<b>A4</b>	0,37 a	0,24 a	0,27 b	0,39 a	0,33 b	0,24 b
<b>A5</b>	0,41 a	0,29 a	0,40 a	0,32 b	0,25 c	0,32 a
<b>A6</b>	0,38 a	0,32 a	0,35 a	0,34 b	0,30 b	0,30 a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O comprimento de raiz (CR) apresentou menores valores nas plântulas expostas à cumarina A1, principalmente nas maiores concentrações, sendo a maior concentração responsável pelo menor valor de todo o experimento (1,97 mm). Com relação ao comprimento de parte aérea (CPA), houve menor variação nos valores, ainda assim os menores valores são atribuídos às plântulas expostas à cumarina A1 (Figura 3).



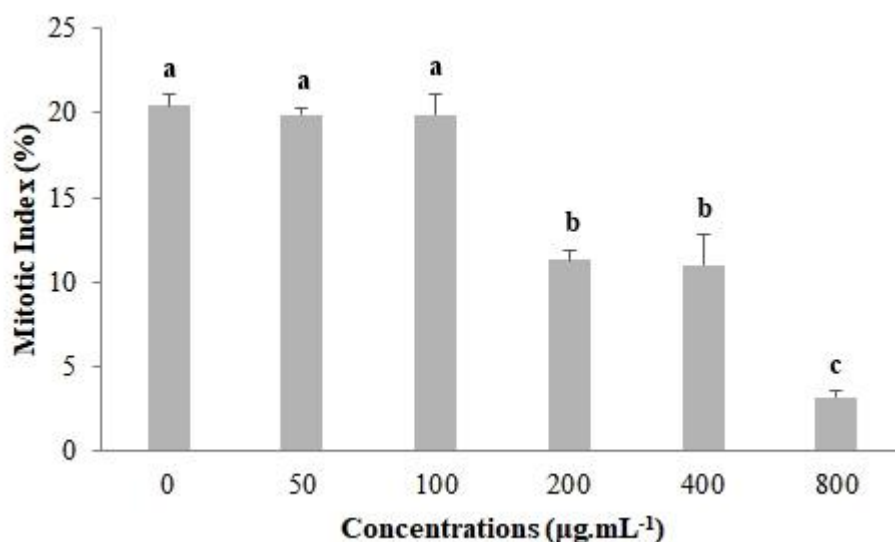
**Figura 3.** Médias obtidas para comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA), em milímetros, de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às seis cumarinas sintéticas. **A.** Controle. **B.** 50 µg.mL<sup>-1</sup>. **C.** 100 µg.mL<sup>-1</sup>. **D.** 200 µg.mL<sup>-1</sup>. **E.** 400 µg.mL<sup>-1</sup>. **F.** 800 µg.mL<sup>-1</sup>. Colunas de mesma cor seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barra: erro padrão.

O ensaio de fitotoxicidade demonstrou que a cumarina A1 foi a mais responsiva, ou seja, a que causa maior efeito fitotóxico em *Lactuca sativa* pela redução drástica dos parâmetros NPN, BF, CR e CPA. Sendo assim, os ensaios subsequentes foram realizados apenas com a cumarina A1.

### 3.3. Ensaio de citogenotoxicidade

As análises do índice mitótico (IM) da cumarina A1 revelaram que as concentrações 50 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente do controle, enquanto as concentrações 200 e

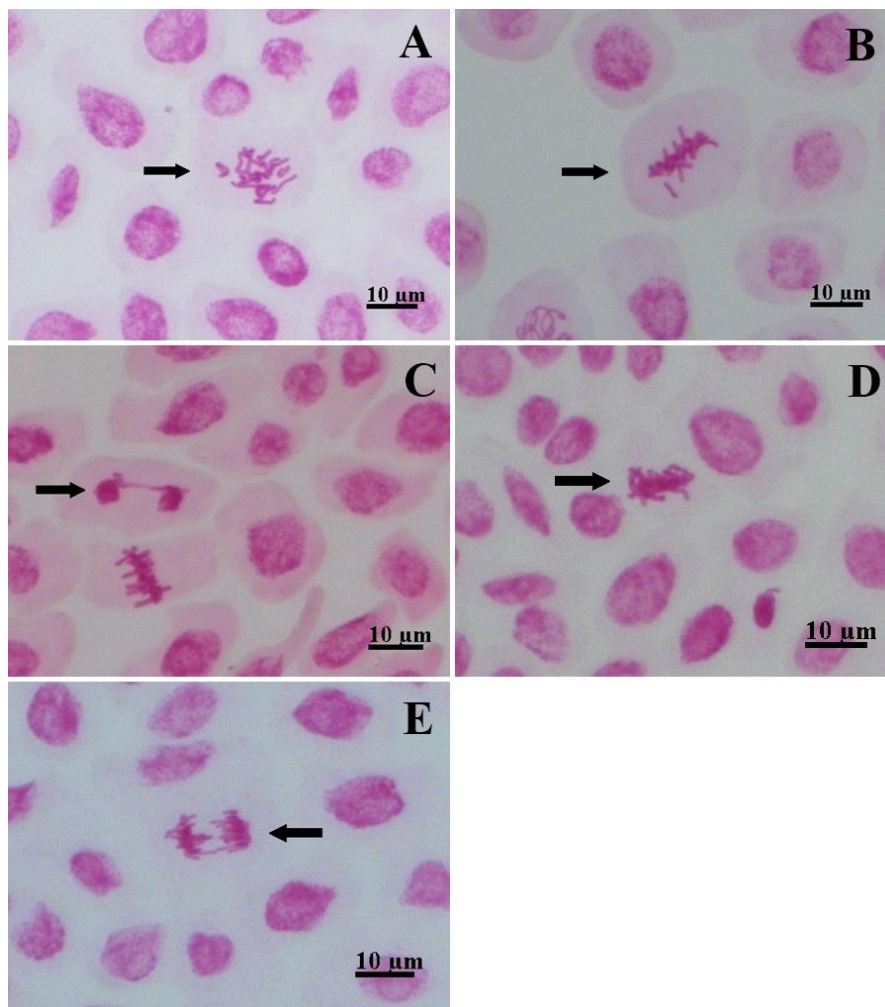
400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sofreram uma redução de aproximadamente 45% em relação ao controle, porém foram iguais entre si; e a concentração 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  diferiu de todas as outras, reduzindo o IM em 74,5% comparado ao controle (Figura 4).



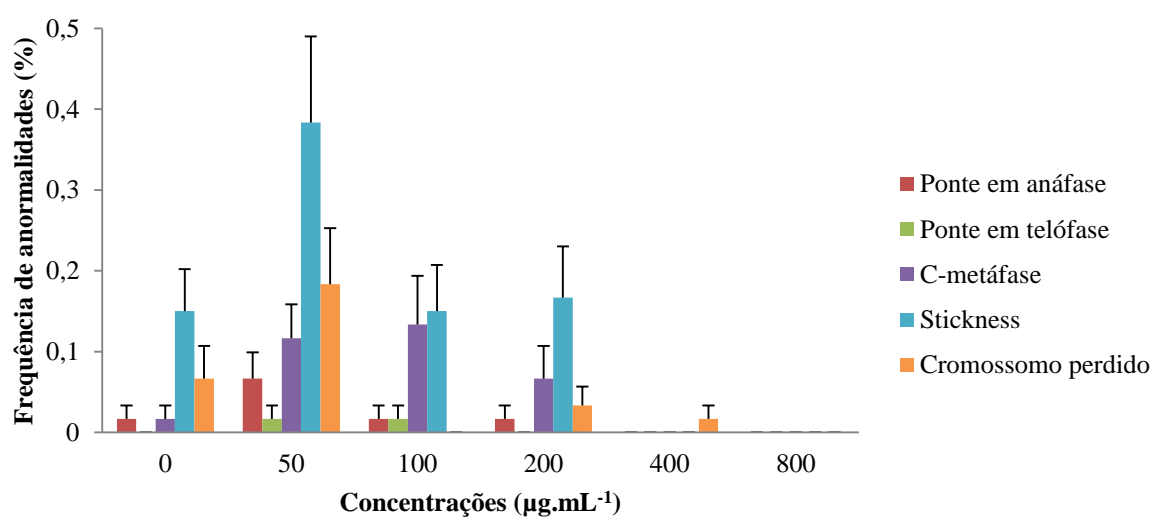
**Figura 4.** Médias obtidas para índice mitótico (IM), em porcentagem, de pontas de raízes de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações da cumarina A1.

Com relação às anormalidades cromossômicas (AC), foram identificadas ponte em anáfase, ponte em telófase, stickiness, cromossomo perdido e c-metáfase (Figura 5). A maior frequência de anormalidades foi observada na concentração 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo stickiness a mais frequente (Figura 6). Não foram encontrados micronúcleos em nenhum dos tratamentos.





**Figura 5.** Anormalidades cromossômicas (AC) identificadas nas pontas de raízes de *Lactuca sativa*. **A.** C-metáfase. **B.** Cromossomo perdido. **C.** Ponte em telófase. **D.** Stickiness. **E.** Ponte em anáfase.

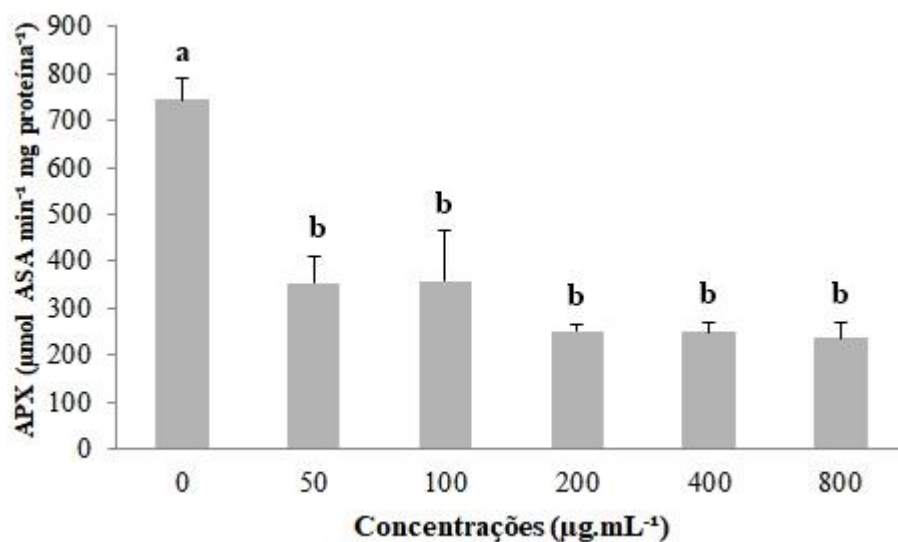


**Figura 6.** Frequência de anormalidades cromossômicas (AC), em porcentagem, identificadas na zona meristemática de raízes de *Lactuca sativa* expostas às diferentes concentrações da cumarina A1. Barra: erro padrão.

### 3.4. Ensaio da atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

As atividades da SOD, da CAT e a peroxidação lipídica não demonstraram diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância ( $p = 0,1110$ ,  $p = 0,1050$  e  $p = 0,3395$ , respectivamente) entre as concentrações da cumarina A1, portanto os dados não são apresentados.

A peroxidase do ascorbato (APX) apresentou redução de atividade em todas as concentrações da cumarina A1 em comparação ao controle, porém as concentrações não diferiram entre si (Figura 7).



**Figura 7.** Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em plântulas de *Lactuca sativa* expostas às diferentes concentrações da cumarina A1. Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barra: erro padrão.

## 4. DISCUSSÃO

A análise da porcentagem de germinação (%G) demonstrou que a concentração 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da cumarina A1 foi o único tratamento que apresentou toxicidade suficiente para reduzir a germinação. Resultados semelhantes foram encontrados por Saleh, Madany e González [29], que estudaram o efeito da cumarina 1,2-benzopirona sobre a germinação de *Vicia faba* L. e demonstraram que a porcentagem de germinação só sofreu redução na maior concentração testada, tendo as demais apresentado comportamento semelhante ao controle. Suksungworn et al. [30] testaram o efeito de duas cumarinas (isoescopoletina e umbeliferona)

sobre a germinação de *Mimosa pigra* e relataram que, no sétimo dia de exposição às cumarinas, a porcentagem de germinação de *Mimosa pigra* não diferiu entre os tratamentos e o controle, independente da concentração testada.

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) não foi afetado pelas cumarinas testadas neste trabalho. Resultados distintos deste foram encontrados por Saleh, Madany e González [29] e Suksungworn et al. [30], que relataram que as cumarinas, embora não tenham influenciado a %G dos biotestes utilizados, reduziram a velocidade da germinação, alterando o IVG entre os tratamentos e o controle, principalmente nas maiores concentrações. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as seis cumarinas sintéticas testadas têm pouca interferência sobre o processo germinativo, embora possam influenciar nos parâmetros de crescimento.

O número de plântulas (NP) também não foi afetado, o que demonstra que as sementes germinadas conseguem desenvolver raiz e parte aérea. Porém, diversos estudos realizados com cumarinas relatam inibição do comprimento das raízes e/ou anormalidades no sistema radicular [16,17,31,32], o que também foi verificado neste estudo. O número de plântulas normais (NPN) foi drasticamente afetado pelas cumarinas testadas, tendo as maiores concentrações apresentado raízes atrofiadas, escurecidas e/ou anômalas; e o comprimento de raiz (CR) foi um dos parâmetros mais negativamente afetado pelas cumarinas, sendo que a redução mais evidente foi observada nas plântulas expostas à cumarina A1, demonstrando sua alta fitotoxicidade. De acordo com diversos trabalhos realizados com cumarinas, o CR é o principal parâmetro onde se verifica o efeito tóxico destes compostos, causando reduções drásticas no comprimento radicular em relação ao controle [8,17,30,32,33], pois as raízes são consideradas o primeiro alvo das cumarinas [34]. Lupini et al. [16] propuseram que o efeito inibitório promovido pelas cumarinas sobre o sistema radicular de *Zea mays* pode ser mediado pela auxina, e Lupini et al. [17] confirmaram que o desenvolvimento de raízes de *Arabidopsis thaliana* foi influenciado por uma interação existente entre cumarina e o transporte polar de auxina, e isto pode ter ocorrido com as plântulas de *Lactuca sativa* deste estudo.

O comprimento de parte aérea (CPA) sofreu menor influência das cumarinas do que o CR, o que demonstra que a raiz é mais sensível às cumarinas do que a parte aérea. Isto pode ser constatado em outros estudos que evidenciaram que, quando expostas a outros grupos de aleloquímicos, as plantas tendem a apresentar maiores danos no sistema radicular do que na parte aérea, pois a raiz é o órgão que primeiro mantém contato com o meio, além de apresentar maior sensibilidade à ação destes compostos em comparação à parte aérea [15,35]. Além disso,

diversos autores relataram redução na biomassa fresca (BF) em espécies de plantas submetidas à ação de cumarinas, principalmente em maiores concentrações destes compostos [8,20,29], corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Saleh, Madany e González [20] demonstraram que o crescimento das plantas de *Vicia faba* foi afetado pela cumarina 1,2-benzopirona devido ao fato de esta substância interferir na regulação dos fito-hormônios endógenos ácido indolilacético (AIA), ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA3). No presente trabalho, a cumarina A1 foi responsável pela maior redução do CPA e da BF na concentração 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , podendo este efeito ser correlacionado a uma diminuição da biossíntese dos fito-hormônios citados ou à sua degradação.

Os valores encontrados no índice mitótico (IM) corroboram com os dados obtidos para o CR, onde há uma diminuição desses parâmetros conforme há aumento da concentração da cumarina A1 utilizada. Na concentração 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi encontrado o menor CR, que é justificado pela redução drástica do IM verificada nas análises citogenotóxicas. Os resultados obtidos corroboram com os resultados encontrados por Yan et al. [36] e Yuksel e Aksoy [37], que estudaram o efeito das cumarinas umbeliferona e dafnoretina sobre o índice mitótico de *Lactuca sativa*, e 1,2-benzopirona sobre *Lens culinaris*, respectivamente, e relataram uma diminuição do IM conforme o aumento das concentrações utilizadas. Algumas cumarinas possuem atividade antimitótica já relatada na literatura, pela capacidade de induzir apoptose ou estacionar o ciclo celular nas fases G0, G1, S ou G2-M [38–40]. Isso demonstra que a cumarina A1 afeta a zona meristemática das raízes e causa danos no ciclo celular, evidenciando sua citotoxicidade, provavelmente devido ao bloqueio da síntese de ácidos nucleicos, como discutido por Yuksel e Aksoy [37].

O controle apresentou anormalidades cromossômicas (AC), provavelmente devido à alta frequência de divisão celular da cultivar de *Lactuca sativa* utilizada (Babá de verão), como demonstrado por Santos et al. [41]. As AC estão diretamente relacionadas à taxa de divisão celular, isto é, quanto maior o IM, maior a chance de ocorrência de anormalidades. Neste estudo, verificou-se uma baixa frequência de AC nas concentrações mais altas da cumarina A1, provavelmente devido à redução nas taxas de divisão celular de *L. sativa* exposta a essas concentrações. Porém, a maior frequência de AC foi observada na concentração 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (306,68% em relação ao controle), demonstrando o efeito getonóxico da cumarina A1, sendo o stickiness a mais frequente, seguido de cromossomo perdido. De acordo com Leme e Marin-Morales [18], quebras e pontes cromossômicas indicam uma ação clastogênica do toxicante sobre o bioteste, enquanto cromossomos perdidos, atrasados, stickiness ou c-metáfases resultam

de efeitos aneugênicos. Assim, verifica-se que a cumarina A1 proporcionou tanto efeito clastogênico quanto aneugênico sobre *Lactuca sativa*, sendo o efeito aneugênico mais evidente devido à alta frequência de stickiness e cromossomo perdido promovida pela concentração 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [18,19].

A quantificação de peroxidação lipídica e as atividades das enzimas SOD, CAT e APX demonstram que a cumarina A1 não promoveu estresse oxidativo em *Lactuca sativa*. Os dados do presente trabalho contrapõem os resultados encontrados por Araniti et al. [20], que relataram um aumento de cerca de 48% da peroxidação lipídica em relação ao controle em *Arabidopsis thaliana* exposta à 1,2-benzopirona. El-Shora e El-Gawad [42] estudaram o efeito do extrato foliar de *Portulaca oleracea* L., o qual é rico em cumarinas, sobre o bioteste *Cucurbita pepo* L. e observaram aumento concentração-dependente da peroxidação lipídica e da atividade enzimática da SOD, CAT e APX, e correlacionou o aumento observado nestes parâmetros a um forte estresse oxidativo causado pelo extrato. A espécie *Lactuca sativa* também apresenta aumento na peroxidação lipídica e/ou na atividade de uma ou mais enzimas antioxidantes quando está sob estresse oxidativo [36,44–46], o que não foi verificado neste estudo, demonstrando que a fitotoxicidade promovida pela cumarina A1 não ocorre por meio de estresse oxidativo.

## 5. CONCLUSÃO

As seis cumarinas sintéticas avaliadas possuem ação aleloquímica evidenciada principalmente nas maiores concentrações, ou seja, interferem no crescimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa*, sendo a cumarina A1 a molécula mais tóxica por ter promovido drástica redução do número de plântulas normais, biomassa fresca, alongamento de raiz e comprimento de parte aérea.

A cumarina A1 tem influência sobre o ciclo celular, reduzindo o índice mitótico e aumentando a frequência de anormalidades cromossômicas, demonstrando o efeito citotóxico e aneugênico da molécula sobre o bioteste. Porém, estes efeitos não podem ser correlacionados a um possível estresse oxidativo, pois a cumarina A1 não promoveu peroxidação lipídica e não alterou a atividade da SOD e CAT, além de ter reduzido a atividade da APX.

As alterações fisiológicas e citogenéticas causadas pela cumarina A1 aqui descritas consistem em subsídios para a compreensão da ação aleloquímica das cumarinas e o seu potencial uso na produção de herbicidas naturais.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo teve suporte financeiro da FAPEMIG [APQ-02123-14]; CAPES e CNPq [bolsas de pesquisa].

## REFERÊNCIAS

- [1] S. Anese, L.J. Jatobá, P.U. Grisi, S.C.J. Gualtieri, M.F.C. Santos, R.G.S. Berlinck, Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots, *Ind. Crops Prod.* 74 (2015) 28–35. doi:10.1016/j.indcrop.2015.04.042.
- [2] S. Cordeau, M. Triolet, S. Wayman, C. Steinberg, J.P. Guillemin, Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management, *Crop Prot.* 87 (2016) 44–49. doi:10.1016/j.cropro.2016.04.016.
- [3] M.P. Pes, M.A. Mazutti, T.C. Almeida, L.E. Curioletti, A.A. Melo, J.V.C. Guedes, R.C. Kuhn, Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds, *African J. Agric. Res.* 11 (2016) 4242–4249. doi:10.5897/AJAR2016.11639.
- [4] R.M. Kuster, L.M. Rocha, Cumarinas, cromonas e xantonas, in: C.O.S. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (Org.), *Farmacognosia da planta ao medicamento*, UFSC, Florianópolis, 2007, pp. 537-556
- [5] M.P. Dias, R.M. Nozari, E.R. Santarém, Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*, *Allelopath. J.* 42 (2017) 21–35. doi:10.26651/2017-42-1-1103.
- [6] S.M. Razavi, Plant coumarins as allelopathic agents, *Int. J. Biol. Chem.* 5 (2011) 86–90. doi:10.3923/ijbc.2011.86.90.
- [7] C.X. Wu, G.Q. Zhao, D.L. Liu, S.J. Liu, X.X. Gun, Q. Tang, Discovery and weed inhibition effects of coumarin as the predominant allelochemical of yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*), *Int. J. Agric. Biol.* 18 (2016) 168–175. doi:10.17957/IJAB/15.0082.
- [8] F. Araniti, R. Mancuso, A. Lupini, S. Giofrè, F. Sunseri, B. Gabriele, M. Abenavoli, Phytotoxic Potential and Biological Activity of Three Synthetic Coumarin Derivatives as New Natural-Like Herbicides, *Molecules.* 20 (2015) 17883–17902. doi:10.3390/molecules201017883.
- [9] C.M. Farley, D.F. Dibwe, J.Y. Ueda, E.A. Hall, S. Awale, J. Magolan, Evaluation of synthetic coumarins for antiausterity cytotoxicity against pancreatic cancers, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 1471–1474. doi:10.1016/j.bmcl.2016.01.054.
- [10] J. Klenkar, M. Molnar, Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents, *J. Chem. Pharm. Res.* 7 (2015) 1223–1238. <http://jocpr.com/vol7-iss7-2015/JCPR-2015-7-7-1223-1238.pdf>.
- [11] M. Neelgundmath, K.R. Dinesh, C.D. Mohan, F. Li, X. Dai, K.S. Siveen, S. Paricharak, D.J. Mason, J.E. Fuchs, G. Sethi, A. Bender, K.S. Rangappa, O. Kotresh, Basappa, Novel synthetic coumarins that targets NF- $\kappa$ B in Hepatocellular carcinoma, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 893–897. doi:10.1016/j.bmcl.2014.12.065.
- [12] A. Ciszewski, G. Milczarek, Preparation and General Properties of Chemically Modified Electrodes Based on Electrosynthesized Thin Polymeric Films Derived from Eugenol, *Electroanalysis.* 13 (2001) 860–867.
- [13] D. Kishore, S. Kannan, Double bond migration of eugenol to isoeugenol over as-synthesized hydrotalcites and their modified forms, *Appl. Catal. A Gen.* 270 (2004) 227–235. doi:10.1016/j.apcata.2004.05.008.
- [14] C. Ueda, D.C. Tse, Stability of Catechol Modified Carbon Electrodes for Electrocatalysis of Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide and Ascorbic Acid, *Anal. Chem.* 54 (1982) 850–856.
- [15] G.S. Gusman, A.H.C. Bittencourt, S. Vestena, Allelopathy of *Baccharis*

- dracunculifolia* DC. on the germination and development of cultivated species, *Acta Sci. - Biol. Sci.* 30 (2008) 119–125. doi:10.4025/actascibiolsci.v30i2.3592.
- [16] A. Lupini, A. Sorgona, A.J. Miller, M.R. Abenavoli, Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis., *Plant Signal. Behav.* 5 (2010) 1395–1400. doi:10.4161/psb.5.11.13021.
- [17] A. Lupini, F. Araniti, F. Sunseri, M.R. Abenavoli, Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Growth Regul.* 74 (2014) 23–31. doi:10.1007/s10725-014-9893-0.
- [18] D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutat. Res. Mutat. Res.* 682 (2009) 71–81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002.
- [19] D.S. Pesnya, A. V. Romanovsky, D.A. Serov, N.Y. Poddubnaya, Genotoxic effects of *Heracleum sosnowskyi* in the *Allium cepa* test, *Caryologia.* 70 (2017) 55–61. doi:10.1080/00087114.2016.1272313.
- [20] F. Araniti, M. Scognamiglio, A. Chambery, R. Russo, A. Esposito, B. D’Abrosca, A. Fiorentino, A. Lupini, F. Sunseri, M.R. Abenavoli, Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated -omic approach, *J. Plant Physiol.* 213 (2017) 30–41. doi:10.1016/j.jplph.2017.02.013.
- [21] J.R. V Iganci, V.L. Bobrowski, G. Heiden, V.C. Stein, B.H.G. Rocha, Effect of aqueous extracts of the “boldo” species on the germination and mitotic index of *Allium cepa* L., *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* 73 (2006) 79–82.
- [22] E.F. George, *Plant Propagation by Tissue Culture*, third ed., Springer, 2008.
- [23] G. Chiapusio, a M. Sanchez, M.J. Reigosa, L. Gonzalez, F. Pellissier, Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process?, *J. Chem. Ecol.* 23 (1997) 2445–2453. doi:10.1023/B:JOEC.0000006658.27633.15.
- [24] L.D.O. Ribeiro, S. Barbosa, F.P. Balieiro, L.A. Beijo, B.R. Santos, L.V. Gouvea, C.M.C.P., Phytotoxicity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville leaf extracts in lettuce bioassay, *Rev. Bras. Biociências.* 10 (2012) 220–225.
- [25] C.N. Giannopolitis, S.K. Ries, Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants, *Plant Physiol.* 59 (1977) 309–314. doi:10.1104/pp.59.2.309.
- [26] E.A. Havir, N.A. McHale, Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves, *Plant Physiol.* 84 (1987) 450–455.
- [27] Y. Nakano, K. Asada, Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, 22 (1981) 867–880.
- [28] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal Lipid Peroxidation, in: *Methods Enzymol.*, 1978: pp. 302–310. doi:10.1088/1742-6596/71/1/012004.
- [29] A.M. Saleh, M.M.Y. Madany, L. González, The Effect of Coumarin Application on Early Growth and Some Physiological Parameters in Faba Bean (*Vicia faba* L.), *J. Plant Growth Regul.* 34 (2015) 233–241. doi:10.1007/s00344-014-9459-4.
- [30] R. Suksungworn, N. Srisombat, S. Bapia, M. Soun-Udom, N. Sanevas, N. Wongkantrakorn, P. Kermanee, S. Vajrodaya, S. Duangsrissai, Coumarins from *Haldina cordifolia* lead to programmed cell death in giant mimosa: Potential bio-herbicides, *Pakistan J. Bot.* 49 (2017) 1173–1183.
- [31] M.R. Abenavoli, A. Sorgonà, S. Albano, G. Cacco, Coumarin differentially affects the morphology of different root types of maize seedlings, *J. Chem. Ecol.* 30 (2004) 1871–1883. doi:10.1023/B:JOEC.0000042407.28560.bb.
- [32] T.J. Haig, T.J. Haig, A.N. Seal, J.E. Pratley, M. An, H. Wu, Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide, *J. Chem. Ecol.* 35 (2009) 1129–1136. doi:10.1007/s10886-009-9689-2.



- [33] E. Niro, R. Marzaioli, S. De Crescenzo, B. D'Abrosca, S. Castaldi, A. Esposito, A. Fiorentino, F.A. Rutigliano, Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community, *Soil Biol. Biochem.* 95 (2016) 30–39. doi:10.1016/j.soilbio.2015.11.028.
- [34] O. Schreiner, H.S. Reed, The Toxic Action of Certain Organic Plant Constituents, *Bot. Gaz.* 45 (1908) 73–102.
- [35] H.M. de Andrade, A.H.C. Bittencourt, S. Vestena, Allelopathic potential of *Cyperus rotundus* L. upon cultivated species, *Cienc. E Agrotecnologia.* 33 (2009) 1984–1990. doi:10.1590/S1413-70542009000700049.
- [36] Z. Yan, D. Wang, H. Cui, D. Zhang, Y. Sun, H. Jin, X. Li, X. Yang, H. Guo, X. He, L. Pan, X. Ren, K. Guo, B. Qin, Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings, *Acta Physiol. Plant.* 38 (2016). doi:10.1007/s11738-016-2270-z.
- [37] B. Yuksel, O. Aksoy, Cytological effects of coumarin on the mitosis of *Lens culinaris* Medik, *Fresenius Environ. Bull.* 26 (2017) 6400–6407.
- [38] J.-Y. Chuang, Y.-F. Huang, H.-F. Lu, H.-C. Ho, J.-S. Yang, T.-M. Li, N.-W. Chang, J.-G. Chung, Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation, *In Vivo (Brooklyn).* 21 (2007) 1003–1010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18210747>.
- [39] Y.M. Ma, Y.B. Zhou, C.M. Xie, D.M. Chen, J. Li, Novel microtubule-targeted agent 6-chloro-4-(methoxyphenyl) coumarin induces G<sub>2</sub>-M arrest and apoptosis in HeLa cells, *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 407–417. doi:10.1038/aps.2011.176.
- [40] S.-M. Yu, D.-H. Hu, J.-J. Zhang, Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 3869–3873. doi:10.3892/mmr.2015.3797.
- [41] S.C. dos Santos, U.A. de Oliveira, L. de O.R. Trindade, M.D.O. Assis, J.M.S. Campos, E.G. Salgado, S. Barbosa, Genotypes selection for plant bioassays using *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L., *Pakistan J. Bot.* 49 (2017) 2201–2212.
- [42] H.M. El-Shora, A.M.A. El-Gawad, Physiological and biochemical responses of *Cucurbita pepo* L. Mediated by *Portulaca oleracea* L. allelopathy, *Fresenius Environ. Bull.* 24 (2015) 386–393.
- [43] A. Estringu, O. Aksakal, D. Tabay, A.A. Kara, Effects of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on UV-B stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 589–597. doi:10.1007/s11356-015-5301-1.
- [44] R.M. Moraes, P.R. Santos Filho, M. Carvalho, M.D.L. Nogueira, S. Barbosa, Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L., *Rev. Bras. Biociências.* 13 (2015) 115–121.
- [45] X. Ren, Z. Yan, X. He, X. Li, B. Qin, Allelopathic effect of  $\beta$ -cembrenediol and its mode of action: Induced oxidative stress in lettuce seedlings, *Emirates J. Food Agric.* 29 (2017) 441–449. doi:10.9755/ejfa.2016-09-1263.
- [46] N.M. Silveira, J.A. de Oliveira, C. Ribeiro, R.A. Canatto, L. Siman, J. Cambraia, F. Farnese, Nitric Oxide Attenuates Oxidative Stress Induced by Arsenic in Lettuce (*Lactuca sativa*) Leaves, *Water, Air, Soil Pollut.* 226 (2015) 1–9. doi:10.1007/s11270-015-2630-0.