

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**PÂMELA INGRID ALVES**

**POTENCIAL ALELOPÁTICO E CITOGENOTÓXICO DE *Eugenia florida* DC EM  
BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa* L.**

---

**ALFENAS / MG**

**2020**

PÂMELA INGRID ALVES

**POTENCIAL ALELOPÁTICO E CITOGENOTÓXICO DE *Eugenia florida* DC  
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

**Coorientador:** Prof. Dr. Marcelo Ap. da Silva

**Colaboradores:**

Dra. Marina de Lima Nogueira

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Daniela Vilas Boas Braga (Mestranda e Bolsista  
CAPES)

João Vitor Calvelli Barbosa (Mestrando e Bolsista  
Capes)

Dr. Renan Gomes Bastos

**Alfenas/MG,  
2020**

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

Alves, Pâmela Ingrid

A474p Potencial alelopático e citogenotóxico de *Eugenia florida* DC em bioensaios com *Lactuca sativa* L. / Pâmela Ingrid Alves. – Alfenas, MG, 2020.  
52 f.: il. –

Orientador: Sandro Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Aleloquímico. 2. Fitotoxicidade. 3. Citogenotoxicidade. 4. Pitanga-do-Cerrado. I. Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD- 581



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG  
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais  
Rua Gabriel Marmo da Silva, 714, Alfenas - MG CEP 37136-000  
Fone: (35) 3701-9035 (Coordenação) / (35) 3701-9288 (Secretaria)  
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



PÂMELA INGRID ALVES

**"Potencial alelopático e citogenotóxico de *Eugenia florida* DC em bioensaios com *Lactuca sativa* L".**

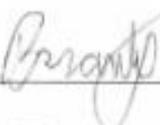
A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 27 de setembro de 2019.

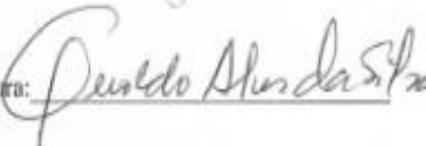
Prof. Dr. Sandro Barbosa  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

***Dedico esse trabalho aos meus pais, minha irmã e a todos que me apoiaram nessa trajetória!!!***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para conduzir com determinação meus objetivos,

A nossa senhora de Fátima que me inspirou em todos os momentos de necessidades e conflitos,

Aos meus pais, Alenizia e Elvecio, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Que nas horas difíceis, de desânimo e cansaço sempre estiveram ao meu lado para me fortalecer. Á vocês toda minha gratidão, amo vocês!

A minha irmã e melhor amiga Isadora Ingrid pela amizade ao longo de todo o percurso, por ser especial e tão importante na minha vida, amo você!!

Ao meu orientador Prof. Dr. Sandro Barbosa, pela oportunidade, confiança, motivação, ensinamentos e conselhos durante todos esses anos de caminhada, sem dúvidas eles foram cruciais para me tornar o que sou!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva pela paciência, dedicação e ensinamentos,

Ao Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva, ao Dr. Renan Bastos e a Dra. Marina Nogueira pela disponibilidade, ensinamentos e contribuições dadas para a melhoria deste trabalho,

Aos meus amigos de laboratório: Gleika Marques, Daniela Braga, Josiele Aparecida, Rafaela Sueko, Kamila Dázio, Valdir Veronese, Gabriela Ezequiel, João Vitor, os quais tornaram essa trajetória mais leve, a vocês todo meu carinho e gratidão! Sem dúvidas vocês se tornaram minha segunda família,

A nossa querida secretária Denise, por ser tão prestativa e carinhosa!!

As minhas amigas e irmãs de coração Katia Fernanda e Letícia Leite pelo carinho, amizade e cumplicidade durante essa etapa tão importante,

A fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais pela concessão da bolsa,

Ao programa de pós-graduação PPGCA pela oportunidade,

E a todos que de uma forma direta ou indireta fizeram parte da realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

## RESUMO GERAL

A busca por herbicidas menos impactantes ao meio ambiente e à saúde humana tem se tornado um constante desafio. Neste contexto, a utilização de extratos de plantas com atividade alelopática tem se tornado uma opção viável aos agricultores, demonstrado grande aceitação no mercado consumidor, visto o baixo custo e fácil produção, promovendo benefício ao ambiente e ao homem. A espécie *Eugenia florida*, demonstra em sua caracterização química a presença de compostos indutores e inibidores da germinação e do crescimento de plântulas. Entretanto, sua atividade ainda é inédita. Além disso, a influência da exposição luminosa das folhas são fatores que interferem na quantidade e qualidade dos compostos produzidos pela planta. Folhas localizadas na periferia (expostas ao sol) da copa tendem a apresentar uma diversidade e quantidade maior de compostos. Os métodos de extração utilizados para a produção dos extratos influenciam na quantidade e no composto que será extraído. Assim, este trabalho teve por objetivo elucidar as propriedades fitotóxicas e citogenotóxicas das folhas da periferia e do interior da copa de *Eugenia Florida*, empregando duas formas de extração aquosa e hidroetanólica sobre bioensaios com *L. sativa*. Foram avaliados os parâmetros germinativos, de crescimento inicial e o comportamento do complemento cromossômico. Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA, e a comparação das médias foram feitas por meio do teste de médias Scott knott a 5% de significância para os extratos. Para as concentrações foi ajustado o modelo de regressão a 5 % de significância. Verificou-se que todos os extratos apresentam atividade alelopática, ou seja, interferem na germinação e no crescimento inicial das plântulas, sendo a maior concentração ( $40\text{mg/mL}^{-1}$ ) a mais responsiva. Ainda, a posição das folhas e o método de extração para a preparação do extrato influencia apenas nas concentrações intermediárias, sendo as folhas da periferia e a extração aquosa as mais eficientes. Além disso, todos os extratos têm influência sobre o ciclo celular, apresentando redução do índice mitótico sendo concentração dependente. Essa dissertação é apresentada sob a forma de capítulos. O capítulo I apresenta uma breve revisão sobre a família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* e a espécie *Eugenia florida*; a alelopatia; os metabólitos secundários; o mecanismo e modo de ação dos aleloquímicos; e a importância dos bioensaios para as análises alelopáticas e citotóxicas. O capítulo II apresenta-se na forma de artigo, formatado de acordo com as normas da revista Ciências Ambientais.

**Palavras chave:** Fitotoxicidade. Aleloquímicos. Pitanga-do-cerrado.

## ABSTRACT

The search for herbicides that have less impact on the environment and human health has become a constant challenge. In this context, the use of plant extracts with allelopathic activity has become a viable option for farmers, which has shown a great acceptance in the consumer market, considering the low cost and easy production, thus promoting benefits to the environment and to man. The *Eugenia florida* species demonstrates in its chemical characterization the presence of inducing and inhibiting compounds for germination and seedling growth. However, its activity is still unprecedented. In addition, the influence of the light exposure of the leaves are factors that interfere in the quantity and quality of the compounds produced by the plant. Leaves located on the periphery (exposed to the sun) of the crown tend to have a greater diversity and amount of compost. The extraction methods used for the production of the extracts influence the amount and the compound that will be extracted. Thus, this work aimed to elucidate the phytotoxic and cytogenotoxic properties of the leaves of the periphery and the interior of the canopy of *Eugenia Florida*, using both aqueous and hydroethanolic forms of extraction on bioassays with *L. sativa*. The germinative parameters, such as initial growth and the behavior of the chromosomal complement, were evaluated. For data analysis, was used ANOVA analysis of variance and the means were compared using the Scott knott means test, at 5% significance for the extracts. For concentrations, the regression model was adjusted to 5% significance. Results demonstrated that all extracts have allelopathic activity, that is, they interfere with the germination and initial growth of seedlings, been the most responsive in the highest concentration. Furthermore, the position of the leaves and the extraction method for the preparation of the extract only influence in intermediate concentrations, which the leaves from the periphery and aqueous extraction were most efficient. In addition, all extracts have an influence on the cell cycle, with a reduction in the mitotic index followed by an increase in concentrations. This dissertation is presented in the form of chapters. Chapter I presents a brief review of the family Myrtaceae, the genus *Eugenia* and the species *Eugenia florida*; allelopathy; secondary metabolites; the mechanism and mode of action of allelochemicals and the importance of bioassays for allelopathic and cytotoxic analyzes. Chapter II is presented in the form of scientific article, formatted according to the guidelines of the journal Environmental Sciences.

**Keywords:** Phytotoxicity. Allelochemicals. Pitanga-do-cerrado.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	11
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	12
2.1 FAMÍLIA Myrtaceae E O GÊNERO <i>Eugenia</i> .....	13
2.2 ESPÉCIE <i>Eugenia florida</i> DC. ....	13
2.3 ALELOPATIA.....	15
2.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS .....	16
2.5 MECANISMO E MODO DE AÇÃO DOS ALELOQUÍMICOS .....	17
2.6 A IMPORTÂNCIA DOS BIOENSAIOS VEGETAIS PARA ANÁLISES ALELOPÁTICAS E CITOTOXICAS.....	18
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	22
4.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>PARTE II</b> .....	30
<b>ARTIGO I</b> .....	30

## PARTE I

### 1 INTRODUÇÃO

A alelopatia oferece uma nova perspectiva de pesquisa, com estudo de compostos químicos liberados por plantas que visa herbicidas menos impactantes ao meio ambiente (REIGOSA, 2013). Essas substâncias químicas são liberadas no ambiente por exsudação radicular, lixiviação foliar, decomposição de resíduos vegetais, volatilização, e incorporação dos compostos no solo (WEIR *et al.*, 2004; IMATOMI *et al.*, 2013). Quando desvencilhadas podem interferir de forma positiva ou negativa no processo de germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas, a partir de ações e processos fisiológicos (EINHEILING *et al.*, 2002; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2018).

Esse fenômeno é mediado por substâncias denominadas aleloquímicas, sendo elas pertencentes a diferentes categorias de compostos tais como, fenóis, terpenos, alcaloides, polietilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros (PEREIRA *et al.*, 2018). Quando liberados no ambiente podem provocar alterações no metabolismo celular, incluindo alterações na permeabilidade da membrana, absorção de nutrientes, síntese de proteína, abertura estomática, fotossíntese e respiração (FERREIRA *et al.*, 2008; CHENG; CHENG; 2015).

Neste contexto, considerando que um dos principais problemas enfrentados pelos agricultores, no mundo, refere-se ao controle de plantas daninhas, e que condicionado a essa situação, o uso frenético de herbicidas sintéticos para controle, tem acarretado grandes impactos ambientais e a saúde humana, a busca por herbicidas que não apresentem as inconveniências dos herbicidas sintéticos e que atendam as necessidades do agricultor, tem se feito frequente. Os fundamentos científicos que norteiam a busca de espécies de plantas que produzam substâncias capazes de interferir no ciclo de plantas daninhas tem se tornado questões fundamentais nos estudos interdisciplinares da atualidade e um importante caminho a se seguir (SILVA *et al.*, 2017).

As espécies típicas do Cerrado apresenta grande relevância para estudos alelopáticos, isso se da em razão de estarem frequentemente expostas a constantes variações ambientais, o que propicia o aumento na produção de metabólitos. Dentro desse bioma destaca-se a família Myrtaceae, sendo representada por aproximadamente 145.970 espécies distribuídas em aproximadamente 145 gêneros. (THE PLANT LIST, 2013).

A espécie *Eugenia florida* DC. popularmente conhecida como “pitanga- do- cerrado”, ou “pitanga preta”, são árvores de pequeno porte, com média de 3,5 m de altura. Possuem frutos comestíveis e agradáveis. A sua caracterização química demonstra a presença de flavonoides,

taninos, terpenos, fenóis (BASTOS *et al.*, 2016), sendo esses compostos indutores de atividade alelopática. De acordo com Ootani et al (2013) os compostos como taninos estão envolvidos no controle da germinação de sementes e na inibição do crescimento e do desenvolvimento de espécies de plantas. As flavonas, em altas concentrações, também apresentam efeito alelopático, podendo inibir o crescimento do vegetal (SOUZA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2018).

No entanto, não foram encontrados na literatura pesquisas que demonstre o efeito alelopático e da citogenotoxicidade de extratos de folhas de *E. florida*. Nesse sentido, determinar os efeitos alelopáticos associados à sua capacidade em gerar modificações no DNA nuclear e na fisiologia de outras plantas, torna-se relevante em estudos sobre os processos de interação ecológica dessa planta com outras e contribui para formulação de produtos agrônômicos menos agressivos (SOARES, 2011). Além disso, o conhecimento do potencial genotóxico de um composto presente no meio ambiente é uma informação importante para as agências regulatórias, no que se refere aos riscos que os produtos oferecem para o homem e o ambiente (OLIVEIRA, 2012).

Donato e Morretes (2009), realizou a caracterização anatômica das folhas dessa espécie, registrando diferenças estruturais entre “folhas de sol” (da periferia da copa) e “folhas de sombra” (do interior da copa). A variação na intensidade e na quantidade de incidência luminosa nas folhas das árvores são fatores que influenciam a anatomia, a qualidade e a quantidade de metabólitos produzidos pela planta. As folhas expostas ao sol sofrem maior estresse ambiental o que provoca o aumento na produção de metabólitos (NETO; LOPES; 2006). Desta forma, o estudo das variações na intensidade luminosa das folhas contribui para conhecimento de possíveis alterações químicas no material em estudo, o que é de fundamental importância em estudos alelopáticos (ARAUJO, 2014).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da posição das folhas sobre o efeito fitotóxico e citogenético de extratos aquosos e hidroetanólicos de *E. florida* sobre bioensaios com *L. sativa*.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

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

## 2.1 FAMÍLIA Myrtaceae E O GÊNERO *Eugenia*

A família Myrtaceae é nativa de regiões tropicais, principalmente na América do Sul, Ásia e Austrália, com cerca de 145.970 espécies distribuídas em aproximadamente 145 gêneros (THE PLANT LIST, 2013). No Brasil, são registrados 23 gêneros e 1034 espécies distribuídas principalmente na Mata Atlântica e Cerrado (TOLEDO, 2018).

Diferentes substâncias com propriedades alelopáticas foram identificadas em diferentes espécies pertencentes a essa família dentre elas, *Myrcia guianensis* Aubl (SOUZA *et al.*, 2006), *Eugenia Flavescens* (FILHO *et al.*, 2016), *Eugenia dysenterica* (GIOTTO *et al.*, 2000, MALHEIROS; 2016) *Blepharocalyx salicifolius* (HABERMAM *et al.*, 2016). Além disso, uma característica marcante dessa família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais contendo terpenos e/ou compostos resinosos e aromáticos (SOUZA *et al.*, 2013). Os óleos essenciais são considerados como potentes inibidores da germinação de sementes e do crescimento de diversas plantas, tanto na forma original quanto em mistura (DUKE *et al.*, 2002).

Dentro dessa família destaca-se o gênero *Eugenia*, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). De acordo com Sobral (2015), cerca de 400 espécies estão distribuídas em diferentes regiões (MAGINA *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2015).

Devido ao seu potencial terapêutico e implicações econômicas, os estudos com *Eugenia* spp. tem se tornado de grande interesse. De acordo com a literatura, apresentam as atividades antioxidante e antitumoral (SANTOS *et al.*, 2018), hipoglicemiante, antimicrobiana (TOLEDO, 2018), e alelopática (IMATORI *et al.*, 2013; FILHO *et al.*, 2016). Tais atividades estão ligadas a presença de diferentes metabólitos secundários como os flavonóis polidroxilados, formados principalmente por aglicona quercetina, miricetina, canferol, mearnsetina e gossipetina, taninos, terpenos e derivados fenólicos (LAGO *et al.*, 2011). No entanto, destaca-se que menos de 10% das espécies desse gênero foram quimicamente e biologicamente estudadas (GILIOLI *et al.*, 2010; FALEIROS, 2017).

Por esse motivo pesquisas que contemplem e contribuam para o melhor entendimento da ação das diferentes espécies pertencentes a esse gênero tornam-se relevantes.

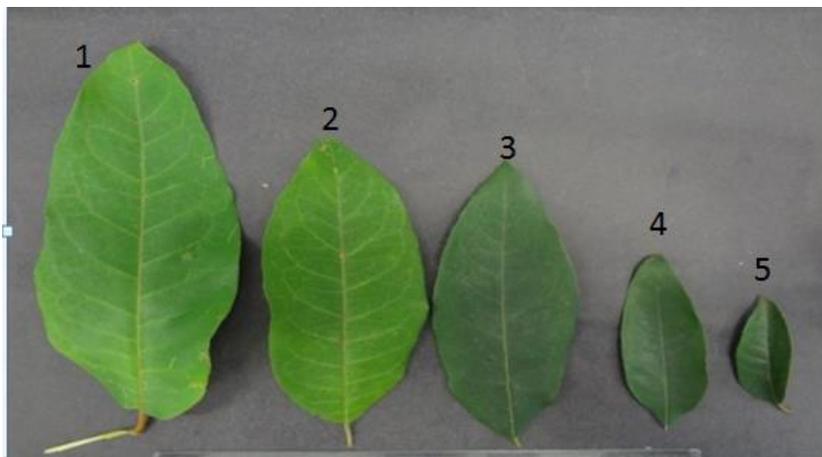
## 2.2 ESPÉCIE *Eugenia florida* DC.

A espécie *Eugenia florida* DC. popularmente conhecida como pitanga- do- cerrado, pitanga preta ou guamirim-cereja, se apresenta como árvores de pequeno porte, com a média de 3,5m de altura, trocos castanho acinzentados de 20 a 35 cm de diâmetro com casca rugosa e

fissurada longitudinalmente. São espécies que tipicamente florescem em outubro e frutificam no final de novembro. Seus frutos apresentam odor característico, são comestíveis e muito saborosos (DONATO; MORRETES; 2009; SANTOS et al., 2018).

Os dados morfológicos e anatômicos da folha de *E. florida* conferem características comuns à família Myrtaceae, como a presença de cavidades secretoras, floema interno ao xilema e alto teor de taninos (CRONQUIST, 1991; DONATO; MORRETES; 2009). Possuem as folhas oblongas com o pecíolo e o limbo diferenciado em “folhas de sol” situadas na base da copa e “folhas de sombra” situada no interior da copa. O limbo mede de 9 a 13,5 cm de comprimento, por 4,5 a 6 cm de largura. O pecíolo mede de 6 a 9 mm de comprimento por 1 a 1,5 mm de diâmetro na base. As maiores dimensões referem-se às folhas de sombra e as menores às folhas de sol (DONATO; MORRETES; 2009).

As folhas mais expostas ao sol se diferem das de sombra por apresentarem maior densidade vascular, mesofilo, espessura laminar e maior compactação de células. Em estado natural as folhas são verdes nas duas faces, apresentando-se um pouco mais clara no lado abaxial (DONATTO; MORRETES; 2009). Na figura 1, pode se observar a diferença morfológica entre as folhas de sol e de sombra.



Fotografia 1- Folhas do interior e da base da copa das árvores da espécie *E. florida*, os números 1 e 2 correspondem as folhas do interior, as de 3 á 5 correspondem as da base da copa.

Fonte: DO AUTOR; 2019.

Devido ao seu potencial terapêutico e biológico, os estudos químicos com a espécie *E. florida* tem se tornado de grande relevância, apontando na literatura atividade anti-oxidante (SANTOS et al., 2018), hipotensora, hipoglicêmica e antipirético; atuando na redução de triglicerídeos e níveis de colesterol; além de serem utilizadas no tratamento de infecções (STEFANELLO et al., 2011).

Extratos de folhas de *E. florida* revelaram atividade contra HIV a partir da presença de ácidos triterpênicos. Ainda, extratos etanólicos de suas folhas mostraram atividade antimicrobiana (BASTOS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018) e anti-diabética (BASTOS *et al.*, 2019). Santos e colaboradores (2018) relatam atividade anti-oxidante e citotóxicas dessa planta em células *in vitro* de mieloplastoma e melanoma humano.

Também apresentam importância ecológica, pois seus frutos suculentos e carnosos são fontes de alimento à fauna silvestre. Muitos animais que se alimentam desses frutos acabam veiculando a dispersão das sementes e favorecendo a sobrevivência e permanência dessas espécies. Frutos de espécies nativas, especialmente as do Cerrado, apresentam aspectos vegetativos e reprodutivos desuniformes. Assim, precisam ser estudados para que seja possível estabelecer critérios de seleções adequados (BORGES *et al.*, 2010).



Fotografia 2- 1 Frutos verdes da espécie *E. florida*; 2 representantes com frutos.

Fonte: BASTOS, 2016.

### 2.3 ALELOPATIA

Com o decorrer do processo evolutivo as plantas desenvolveram a capacidade de produzir compostos capazes de inibir, induzir ou estimular o desenvolvimento de outras plantas, tal processo nomeado como alelopatia. A alelopatia é usualmente definida como qualquer processo envolvendo compostos químicos produzidos por plantas e que, uma vez liberados no ambiente, influenciam o desenvolvimento de outras plantas (XAVIER *et al.*, 2019). Essa interação acarreta uma resposta, positiva ou negativa na planta sensível a tais compostos. Esses compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e são comumente chamados de aleloquímicos (ALMEIDA *et al.*, 2006; XAVIER *et al.*, 2019).

Dentre as diferentes classes de aleloquímicos, os flavonoides, terpenos, alcaloides, taninos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas, são responsáveis por provocar inibição alelopática (FORMAGIO *et al.*, 2010; IMATORI *et al.*, 2013). De acordo com a caracterização química da espécie *E. florida* é possível sinalizar uma possibilidade de atividade alelopática atribuída a ela, visto a presença de metabólitos como flavonoides, taninos, terpenos e ácidos fenólicos (BASTOS *et al.*, 2016).

Os aleloquímicos podem ser liberados de diferentes formas, sendo que as rotas de liberação incluem a volatilização pelas partes aéreas do vegetal, exsudação pelas raízes, a lixiviação das superfícies do vegetal pela chuva, neblina e, principalmente pela decomposição de resíduos vegetais (BEGOSSO; IMATOMI; 2013; WAURECK, 2019). Eles podem atuar de forma indireta, quando o composto alelopático altera as condições químicas e nutricionais do solo; ou direta, quando as substâncias interferem no metabolismo vegetal (MARASCHIN; AQUILA; 2006). Quando liberado podem afetar o balanço hormonal, a estrutura celular, a permeabilidade das membranas, a absorção de minerais, influenciar a fotossíntese; a atividade enzimática; as relações hídricas e a condução de seiva, além de alterar DNA e RNA (MARASCHIN; AQUILA; 2006; CHENG; CHENG; 2015).

## 2.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo primário é responsável pela síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies (BERG; LUBERT; 2008). As diferentes rotas metabólicas desempenhadas pelas plantas são responsáveis pela realização de diferentes processos químicos tais como, a fotossíntese, a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, a síntese de proteínas, as enzimas e coenzimas, a síntese de materiais estruturais, a duplicação do material genético, a absorção de nutrientes, os quais atuam de forma conjunta proporcionando a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento da planta.

Em contrapartida, os metabólitos secundários são fundamentais na defesa e na proteção da planta contra qualquer dano ecológico (PINTO *et al.*, 2013). As vias mais comuns para a biossíntese dos metabólitos secundários são realizadas através das pentoses para os glicídios, do ácido chiquímico para os fenóis, taninos e alcaloides aromáticos, do acetato-malonato para fenóis e alcaloides e do ácido mevalônico para os terpenos, esteroides e alcaloides (PIRES; OLIVEIRA; 2011).

Os três principais grupos de metabólitos são representados pelos compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (FERREIRA; ÁQUILA; 2000; RICE, 2013). Os compostos fenólicos são

representados pelos ácidos fenólicos, flavonoides, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas sendo eles as substâncias comumente associadas com o efeito alelopático (TAIZ; ZEIGER, 2013; PEREIRA, 2018).

O uso de metabólitos secundários de plantas tem representado grande importância no setor econômico, com destaque na produção de alimentos, de cosméticos, produtos terapêuticos e na agroindústria (SARMENTO *et al.*, 2012). A literatura relata que espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* apresentam inúmeras aplicações e pesquisas quanto ao uso dos metabólitos presentes em suas folhas e frutos. Ambos os órgãos apresentam ações anti-microbiana (TOLEDO, 2018), alelopática (IMATORI *et al.*, 2013), antioxidante e antitumoral (SANTOS *et al.*, 2018).

Dentro desse gênero destaca-se a espécie *E. florida*. Segundo Bastos e colaboradores (2016) a triagem química dessa espécie apresenta altos níveis de compostos fenólicos, como os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos, bem como outras classes de compostos incluindo as saponinas e os terpenóides. Tais metabolitos podem agir isoladamente ou sinergicamente, influenciando na germinação e no crescimento inicial de plantas (GONZÁLEZ; COLOMA *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2015; FILHO *et al.*, 2017).

Ainda, foram realizadas por esses mesmos autores, a análise química da planta, a qual apresenta compostos como a quecetrina, a catequina, a quercetina e o ácido betulínico (BASTOS *et al.*, 2019). De acordo com Filho (2017), ao testar a ação dessas mesmas substâncias contra plantas teste verifica-se inibição no processo de germinação.

Assim, levando em consideração a presença dessas diferentes classes de compostos e sua atividade, a averiguação da possível ação alelopática da espécie *E. florida* se torna de extrema valia, tendo como perspectiva a produção de bioherbicidas menos impactantes ao ambiente.

## 2.5 MECANISMO E MODO DE AÇÃO DOS ALELOQUÍMICOS

O mecanismo de ação dos aleloquímicos e o modo pelos quais eles modificam o crescimento e o desenvolvimento das plantas tem sido para os pesquisadores um contínuo desafio. Isto se dá em razão da limitada disponibilidade de trabalhos de pesquisa que abordam essa questão. Normalmente os aleloquímicos são avaliados pelos seus impactos provocados na germinação das sementes ou em algum aspecto do crescimento das plantas, levando em consideração a sequência de eventos celulares que pode ocorrer devido à redução no crescimento (PIRES; OLIVEIRA; 2011).

Uma maneira de se avaliar o modo de ação de um aleloquímico específico seria por meio do monitoramento do efeito deste produto sobre as principais funções das plantas. As pesquisas neste sentido têm permitido concluir que os aleloquímicos interferem em muitos dos processos do metabolismo primário e no sistema de crescimento das plantas. De maneira geral, a ação dos aleloquímicos se resume à interferência nas atividades vitais das plantas, ou seja, na fotossíntese, na respiração, na assimilação de nutrientes, na síntese de proteínas, nas atividades enzimáticas, na permeabilidade da membrana e no desenvolvimento da planta (SIQUEIRA *et al.*, 1991).

As diferentes classes de compostos fenólicos podem modificar a biossíntese dos principais constituintes das plantas e a distribuição de carbono nas células. De acordo com a literatura, a redução de carbono na célula pode comprometer a produção de carboidratos, sendo ele o responsável pela reserva de energia para o metabolismo celular (TAIZ; ZEIGER; 2017). Podem provocar ainda, alterações hormonais e modificações das atividades enzimáticas, comprometendo o desenvolvimento do embrião. Os ácidos fenólicos atuam induzindo o aumento da atividade de enzimas oxidativas, causando assim, modificações da permeabilidade da membrana e a formação de lignina, provocando a redução do crescimento radicular da planta (BUBNA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Pires e Oliveira (2011) relatam ainda que as quinonas e os ácidos fenólicos podem interferir nas funções mitocondriais, comprometendo o processo de obtenção de energia necessária para manter as necessidades vitais da planta. A presença de diferentes classes de compostos voláteis provoca alterações da divisão e alongamento celular, comprometendo o crescimento e desenvolvimento do vegetal.

Cheng e Cheng (2015) menciona que os monoterpenos alteram o ciclo celular reduzindo a proliferação de células e a síntese de DNA no meristema da planta, provocando a redução das raízes. Compostos pertencentes a diferentes classes de alcaloides podem inibir a DNA polimerase e impedir a transcrição e tradução do DNA, inibindo a biossíntese de proteínas (ZENG *et al.*, 2001; CHENG; CHENG; 2015). Os flavonoides são os compostos naturais mais presentes nas plantas e apresentam efeitos alelopáticos capazes de inibir a germinação e o crescimento de plantas (RODRIGUES *et al.*; 2019)

## 2.6 A IMPORTÂNCIA DOS BIOENSAIOS VEGETAIS PARA ANÁLISES ALELOPÁTICAS E CITOTOXICAS.

Os herbicidas são a classe de defensivos com maior demanda pela agricultura brasileira. Constatou-se predomínio dos cultivos de soja, de milho e de cana, que juntos corresponderam

a 76% da área plantada no Brasil em 2015 (PIGNATI *et al.*, 2017). A utilização em larga escala desse produto tem trazido uma série de problemas ambientais, com impactos significativos na biota e riscos ao homem (PERES; MOREIRA; 2007; SILVA, 2017). Sabendo que não é possível descartar o uso de herbicidas sintéticos completamente, o manejo com os herbicidas naturais que aja diretamente na planta invasora pode reduzir seu uso de forma que não prejudique a produção agrícola e minimize os danos ambientais (FILHO *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o estudo dos metabolitos secundários com efeitos alelopáticos se tornaram uma importante ferramenta de estudo para a identificação de plantas que apresentam os compostos bioativos (OLIVEIROS; BATISDAS; 2008; SILVA, 2017), a partir dos quais podem ser produzidos os herbicidas naturais mais específicos e menos prejudiciais ao meio ambiente (MACÍAS *et al.*, 1998).

A utilização de ensaios biológicos vegetais para o monitoramento da atividade de extratos, de frações e de compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado à identificação e ao monitoramento de substâncias potencialmente alelopáticas (NOLDIN *et al.*, 2003). Essa técnica é caracterizada por apresentar baixo custo, a eficiência e os resultados rápidos de pesquisa, razão pela qual à torna atrativa e, atualmente, muito utilizada pelos pesquisadores.

De acordo com Matias (2018) e Costa (2019), a alfaca é recomendada como organismo-teste para avaliar as respostas fitotóxicas e citogenotóxicas de experimentos com os aleloquímicos devido à alta sensibilidade a esses compostos, em especial, durante a fase de germinação e de crescimento das plântulas. O determinado bioteste contempla diversas peculiaridades, dentre elas, rápida germinação onde sofrem rápidas mudanças fisiológicas e tornam-se altamente sensíveis ao estresse ambiental. Além disso, possuem crescimento linear em ampla faixa de variação de pH, a baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos, grande número de células em divisão na zona meristemática radicular (SIMÕES, 2013).

A avaliação da citotoxicidade de substâncias é realizada a partir da avaliação das alterações celulares, que incluem a inibição do índice mitótico, a incidência de mutações cromossômicas, como, as quebras cromáticas, a perda de cromossomos inteiros e/ ou a formação de micronúcleos.

O índice mitótico pode ser usado como indicador de proliferação adequada das células, aplicados em estudos de toxicidade e de mutagenicidade (CHIAVEGATTO, 2014), no qual a citotoxicidade de determinadas substâncias pode ser obtida pela redução ou aumento do índice mitótico (LEME; MARIN-MORALES; 2009)

Segundo Solano (2015), o bioteste *L. sativa* tem se demonstrado eficaz para análises de citogenotoxicidade pois está em constante divisão mitótica, o que torna possível a identificação das alterações ocorridas ao longo do ciclo celular. Ainda, Campos et al (2008), relata que os danos no complemento cromossômico da alface são favorecidos pelo fato da espécie possuir características citogenéticas estáveis e bem definidas, como cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n = 2x = 18$ ).

### 3 JUSTIFICATIVA

Um dos maiores problemas enfrentados pelos agricultores está no controle de plantas daninhas. De acordo com um levantamento realizado pela Embrapa, plantas daninhas geram perdas que chegam a 15% da produção mundial de grãos todos os anos. A ausência de um controle adequado pode provocar perda de até 40% da produção de uma lavoura. Ainda, os efeitos impactantes provocados pelo uso excessivo de herbicidas sintéticos na agricultura convencional tem demonstrado danos bioacumulativos no ambiente, causando a contaminação de solos e rios e a saúde humana. Associado a isso, o uso excessivo desse produto tem provocado a resistência de plantas daninhas. Na perspectiva de amenizar esses impasses, a busca de herbicidas naturais, que não apresentem as inconveniências dos produtos sintéticos, e que atuem na redução dessas pragas agrícolas são questões fundamentais nos estudos interdisciplinares na atualidade. Estudos que visem descobrir quais são as espécies de plantas que apresentam efeitos de controle biológicos, podem ser de grande importância para a comunidade científica e para as indústrias de biotecnologias, pois possibilitam a identificação dos compostos químicos, os quais poderão servir como base para a produção de herbicidas mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente, quando comparados aqueles usados na agricultura. Assim, o presente trabalho teve como objetivo averiguar a atividade de extratos de folhas da espécie *E. florida*, uma planta típica do Cerrado e que apresenta uma composição química rica em compostos potencialmente alelopáticos.

## **4 OBJETIVOS**

A seguir, são apresentados os objetivos gerais e específicos do estudo dos extratos obtidos das folhas da espécie *E. florida*.

### **4.1 - OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o efeito alelopático e citogenotóxico da *E. florida* em sementes de *Lactuca sativa* L.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar os efeitos do extrato aquoso e hidroetanólico de folhas expostas a diferentes intensidades luminosas da espécie *E. florida* sobre os parâmetros germinativos, de crescimento inicial e citogenotóxicos em *L. sativa*.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Conclui-se que a partir do levantamento bibliográfico as informações obtidas nesses experimentos podem subsidiar programas de controle de plantas daninhas que visam obter produtos eficientes no controle e/ou eliminação de invasoras sem causar danos ao ambiente. Para esse fim, as descrições químicas apresentadas pela espécie em estudo demonstram a presença de compostos capazes de atuar no bloqueio de plantas invasoras em lavouras, entretanto, estudos preliminares ainda não foram realizados, fazendo se necessário sua investigação.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. F. R. **Composição Química e Atividade Alelopática de Extratos Foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. 2006, 105f. Tese Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Botucatu, 2006.

ARAUJO, L. L. N. **Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *tetradenia riparia* (hochst) codd- lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiás, 2014.

BASTOS, et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia florida* DC (Myrtaceae) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Índia, v. 8, p. 110-115, 2016.

BASTOS, et al. Phytochemical Composition, Antioxidant and *in vivo* antidiabetic activities of the hydroethanolic 1 extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. **Revista International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Índia, v.123, p.317-332, 2019.

BEGOSSO, J.G.; WAURECK, A. Influência De Extratos Aquosos de *Lolium multiflorum* L.E *Cyperus rotundus* em sementes de soja. **SCIENTIA RURAL**, Paraná, v. 19, 2019.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Fundamentos de Bioquímica**: Guanabara Koogan. 6° ed. Porto Alegre. 2008.

BOIAGO, N. P.et al. Allelopathic bioactivity of fresh and infused aqueous extracts of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) on lettuce and maize. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 40, p. 40972, 2018.

BORGES, K.C.F. Pulp yield and morphometric characters of fruit and seed of *Eugenia calycina*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32 n.2, 2010.

BUBNA, G.A, et al. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.1627-1633, 2011.

CAVALCANTE, U.L.A. et al. Allelopathic effects of plant extracts of *Hancornia speciosa* Gomes on germination of *Lactuca sativa* L. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p. 147-1604, 2018.

CHENG. F.; CHENG. Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Front Plant Sci**, Australia, v.6 n.1020, 2015.

CHIAVEGATTO, R.B. **Viabilidade celular, índice mitótico e ultraestrutura d calos *Byrsonima verbasifolia* L .DC. (Malpighiaceae)**. 2014. Dissertação de mestrado (Botânica Aplicada), Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2014.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **Nature**, Korea v.402, p.402, 404, 1991.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 759-770, 2009.

DUKE, S.O. et al. Chemicals from Nature for Weed Management. **Weed Science**, Georgia v.2, n.50, p.138-151, 2002.

EINHELLIG, F. A. et al. The physiology of allelochemical action: Clues and Views. **Allelopathy from molecules to ecosystems**, Espanha, p.1,23, 2002.

FALEIROS, J. H. **Estudo químico de *Eugenia dysenterica* DC. (myrtaceae) em associação ao controle de formigas cortadeiras *atta laevigata* e efeito alelopático**.2017. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiás, 2017.

FERREIRA, A. G. et al. Interferência: Competição e Alelopatia. **Germinação: do básico ao Aplicado**, c.16, p. 251, 262, 2004.

FERREIRA, et al. Alelopatia: Uma área Emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Rio de Janeiro, v.12, p.175-204, 2008.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R.B.; SOARES, G.L.G. Potencial Alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostisplana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Rev. Bras. Sementes**, Uberlândia, v. 30, n.2. p. 43-59, 2008.

FILHO, A. J. C. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (myrtaceae). **Química nova**, São Paulo, v. 40, n 3, p. 252-259, 2017.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Potencial alelopático de cinco espécies da família *Annonaceae*. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

GILIOLI, A. **Análise Fitoquímica e Atividade biológica de *Eugenia umbeliflora*. Florianópolis**. 2010, 103f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) Universidade Federal de São Carlos, UFSC, São Carlos, 2010.

GIOTTO, A.C.; OLIVEIRA, S.C.C.; SILVA, J.G.P. Efeito Alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v.2, n.5, p.600-602, 2007.

GONÇALVES, C.A, et al. Gestational Exposureto *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity an dimmuno modulation evaluation in female Swiss mice. **J Ethnopharmacol**, Africa, v.150, p. 843- 850, 2013.

GONZÁLEZ, C. A, et al. Triterpene-based plant defenses. **Rev Phytochem**, Canadá, v.10, n.2, p.245–260, 2011.

HABERMANN, E. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). **Braz. J. Biol**, Brasil, v. 76, n. 2, p. 531-538, 2016.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S.C.J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Bot. Bras**, Brasil, v.27: n.1, p.54-61, 2013.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausell. **Molecules**, v. 16, p. 9827- 9837, 2011.

LEME, D. M; MARIN-MORALES, M. A. Teste de monitoramento ambiental com *Allium cepa*: suas aplicações. **Mutation Research**, Amsterdam, p.71-81, v. 682, 2009.

MACÍAS, F. A. et al. Bioactive Norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. **Phytochemistry**, França, v. 48 n. 4, p. 631-636, 1998.

MAGINA, M. D. A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de Espécies do Gênero *Eugenia***. 2009, 199f. Tese Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química), Universidade Federal de São Carlos, UFSC, Florianópolis, 2009.

MALHEIROS, A. et al. Alelopátia: Interações químicas entre espécies: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos**, p. 503-523, 2016.

MARASCHIM, S. F.; AQUILA, M.E.A. Potencial Alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca Sativa* L. (Asteraceae). **Acta bot. bras**, Brasil, v. 20, n.1 p. 61-69. 2006.

NETO, L. G; LOPES, N. P. Fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Quim Nova**, São Paulo, v.30 n. 2 p. 374- 381, 2006.

NOLDIN, V.F. MONACHE, F.D. YUNES, R.A. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Quím. Nova**. São Paulo, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

OLIVEIRA, A. L. et al. Volatile Compounds from Pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, França, v. 99, n. 1, p. 1-5, 2006.

OLIVEIRA P.V. A et al.; Avaliação Alelopática de *Tithonia diversifolia* na germinação e no crescimento inicial de *Bidens pilosa* e *Brachiaria brizantha*. **Revista Agroambiental**, Brasil, v.3, p.23-30, 2011.

OLIVERA, S.C.D. et al. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum*A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**. Brasil, v.26, n.3, p.607-618. 2012.

OLIVEROS, B. A. J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva**, São Paulo, v.7, n.1, p. 1-34, 2008.

OOTANI, M.A, et al. Use of essential oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v.4, n.2, p.162-174, 2013.

PAULA, C. et al. Estudo do Potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Brasil, v. 1, n. 4, p. 577-584, 2015.

PEREIRA, J.C. et al. Allelopathic Potential and Identification of Secondary Metabolites in extracts of *Canavalia ensiformis* L. **Revista Ceres**, Brasil, v.65, p. 243-252, 2018.

PERES, F; MOREIRA, J. C. Saúde e Ambiente e Sua Relação Com o Consumo de Agrotóxicos em um polo Agrícola do Estado do Rio de Janeiro, **Caderno de Saúde Pública**, Brasil, 2007.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição Espacial do uso de Agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n.10, p.3281-3293, 2017.

PINTO, D.M. et al. Volatile organic compounds in induced plant defense against herbivorous insects. **Quím. Nova**, Brasil, v.36 n.9, 2013.

PIRES, M. N.; OLIVEIRA, V.R. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Alelopati. Embrapa, Brasil, v.5, 2011. E-book.

REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Bot. Bras**, Brasil, v.27 n. 4, p. 629-646, 2013.

RICE, E.L, et al. **Allelopathy**. Academic press, p.421, 2013. E-book.

ROCHA. V. D. et al. Efeito Alelopático de Extratos Aquosos de *Solanum paniculatum* L. na germinação e no crescimento inicial de alface. **Rev. Ciênc. Agroamb**, Brasil, v.16, n.1, 2018.

SANTOS, P.F. P. et al. Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* dc. (myrtaceae) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential. **Quim. Nova**, Brasil, v.41, n. 10, p. 1140-1149, 2018.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no sul do Brasil. **Magistra**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 250-262, 2012.

SILVA, C.P. et al. Plants Extract from Cerrado Sul-Matogrossense with Bioherbicide and Bioinsectice Potential. **Uniciências**, Brasil, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

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

SOARES, A. F. S. **Uso de agrotóxicos, contaminação de mananciais e análise da legislação pertinente: Um estudo na região de Manhuaçu –MG**. 2011. Tese doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2011.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae: Lista de espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2015.

SOLANO, J.D. et al. Avaliação do efeito mutagênico da solução aquosa de *hymenea coubaril* l. com uso dos biotestes *allium cepa* e *Lactuca Sativa*. **Biosfera**, Brazil, v.11 n.21, p. 314, 2015.

SOUZA, A. M. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eugenia pyriformis* cambes, Myrtaceae e estudo da associação sinérgica com agentes antibacterianos e antifúngicos de uso clínico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2013, 118f - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2013.

SOUZA, S.A.M. et al. Atividade alelopática e Citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss). **Ciências Biológicas e Saúde**, Brasil, v.11, n.3, p.7-14, 2005.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chem Biodivers**. Canadá, v.8, p.73–94, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Ed. Artmed, v.5, p.954, Porto Alegre 2013.

TOLEDO, A. G. **Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* DC**. 2018, 110f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2018.

XAVIER, M. V.E. Antioxidant and Allelopathic Potential of *Crataeva tapia* L. **Diversitas Journal**, Brasil, v.4, n.1, p.306-318, 2019.

WEIR, T. L, et al. Biochemical and Physiological Mechanisms mediated Allelochemicals. **Curr Opinion in Plant Bio**, Texas, v. 7, n.4, p. 472-9, 2004.

## **PARTE II**

### **ARTIGO I**

#### **EVALUATION OF TOXICITY OF WATER AND HYDROETANOLIC EXTRACTS FROM INSIDE LEAVES AND BASIS OF THE CUP OF THE SPECIES *Eugenia florida***

AUTORES: Pâmela Ingrid Alves, Marina Nogueira de Lima, Daniela Vilas Boas Braga, João Vitor Calvelli Barbosa, Marcelo Aparecido da Silva, Geraldo Alves da Silva, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme normas da revista **Ciências Ambientais**.  
*Qualis* Ciências Ambientais: B1



**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS AQUOSOS E HIDROETÁNICOS DE FOLHAS DO INTERIOR E PERIFERIA DA COPA DA ESPÉCIE *Eugenia florida*.**

EVALUATION OF TOXICITY OF WATER AND HYDROETANOLIC EXTRACTS FROM INSIDE LEAVES AND BASIS OF THE CUP OF THE SPECIES *Eugenia florida*.

**Pâmela Ingrid Alves<sup>1</sup>**

Marina Nogueira de Lima<sup>1</sup>

Daniela Vilas Boas Braga<sup>1</sup>

João Vitor Calvelli Barbosa<sup>1</sup>

Marcelo Aparecido da Silva<sup>1</sup>

Geraldo Alves da Silva<sup>1</sup>

Sandro Barbosa<sup>1</sup>

**Resumo**

A caracterização química da espécie *Eugenia florida* apresenta diversos compostos capazes de provocar efeitos nocivos sobre plantas, esse atributo possibilita sua utilização como herbicidas menos agressivos ao ambiente. O presente estudo teve por objetivo elucidar as propriedades fitotóxicas e citogenotóxicas das folhas da periferia e do interior da copa de *Eugenia Florida*, empregando duas formas de extração aquosa e hidroetanólica sobre bioensaios com *L. sativa*. Foram avaliados os parâmetros germinativos, de crescimento inicial e citogenéticos. Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA, e a comparação das médias foram feitas por meio do teste de médias Scott knott a 5% de significância para os extratos. Para as concentrações foi ajustado o modelo de regressão a 5 % de significância. Os ensaios de fitotoxicidade demonstram que todos os extratos testados apresentam atividade alelopática e fitotóxica, com danos mais nocivos diante do aumento da dose.

Ainda, nas maiores concentrações não houve diferença entre os extratos. Os ensaios de citogenética demonstram que todos os extratos são citotóxicos, devido as alterações provocados no ciclo celular. As modificações provocadas na planta alvo permite concluir a eficácia dos extratos para o controle de ervas daninhas, demonstrando efetividade nos processos pré-emergentes da plântula. Neste contexto, a pesquisa em questão pode vir a subsidiar programas de controle de plantas daninhas que visam obter produtos eficientes no controle de invasoras sem causar danos ao ambiente. Ou ainda, ser utilizado pelo pequeno agricultor a partir da produção do próprio chá.

**Palavras chave:** Metabólitos especiais; Pitanga-do-Cerrado; Citotoxicidade; Alelopátia.

### **Abstract**

The chemical characterization of the species *Eugenia florida* presents several compounds capable of causing harmful effects on plants, which allows its use as herbicides less aggressive to the environment. The present study aimed to elucidate phytotoxic and cytogenotoxic properties of the leaves of the periphery and the interior of the canopy of *Eugenia Florida*, using two forms of aqueous and hydroethanolic extraction on bioassays with *L. sativa*. In addition, were evaluated the germination, growth and cytogenetics parameters. For data analysis, was used the ANOVA analysis of variance, and the means were compared using the Scott knott means test, at 5% significance for the extracts. For concentrations, the regression model was adjusted to 5% significance. Phytotoxicity tests demonstrate that all tested extracts have allelopathic and phytotoxic activity, with more harmful damage in the face of increased dose. In addition, in the highest concentrations there was no difference between the extracts. Cytogenetics assays demonstrate that all extracts are cytotoxic, mainly due to changes in the cell cycle. The modifications caused in the target plant allow to conclude the efficacy of the extracts for the control of weeds, demonstrating effectiveness in the pre-emergent processes of the seedling. In this context, the research in question may come to subsidize weed control programs that aim to obtain efficient products in the control of weeds without causing damage to the environment. Furthermore, it may be used by the small farmer from the production of the tea itself.

**Keywords:** Special metabolites; Pitanga-do-Cerrado; Cytotoxicity; Allelopathy.

**Pâmela Ingrid Alves**, Marina Nogueira de Lima, Daniela Vilas Boas Braga, João Vitor Calvelli  
Barbosa, Marcelo Aparecido da Silva, Geraldo Alves da Silva, Sandro Barbosa.

---

## INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de herbicida químico para o controle de plantas daninhas tem aumentado freneticamente nas lavouras (SAUSEN et al., 2020). Tal evento tem acarretado impactos ambientais e a saúde humana (SILVA et al., 2017). Na perspectiva de reduzir esses impasses, o uso de substâncias de origem vegetal com atividade alelopática tem aumentado, demonstrando grande aceitação no mercado consumidor, visto ao baixo custo e fácil produção. Apresenta como peculiaridade, menores danos à saúde humana e ao meio ambiente, quando comparado aos herbicidas tradicionais, além de serem produtos facilmente degradáveis (SILVA et al., 2017; LIMA et al., 2018; GRINDI et al., 2020).

De maneira geral, a atividade alelopática das plantas é um evento natural relacionado a produção de aleloquímicos capazes de inibir, induzir ou estimular o desenvolvimento de outras plantas. Essas substâncias podem ser liberadas no ambiente a partir de processos como exsudação radicular, lixiviação foliar, decomposição de resíduos vegetais, volatilização, e incorporação dos compostos no solo (IMATOMI et al., 2001; WEIR et al., 2004; GRIND e COELHO, 2020). Quando em contato com outras plantas podem interferir de forma positiva ou negativa no processo de germinação, crescimento e desenvolvimento afetando processos fisiológicos da planta alvo (FERREIRA e BORGHETTI, 2004; GRIND e COELHO, 2020).

Espécies típicas de biomas como o Cerrado, estão frequentemente expostas a variações ambientais, com climas quentes e secos e ainda, solos áridos e pouco férteis (ARAUJO, 2014). Tais condições provocam maior produção de aleloquímicos pelas plantas, permitindo a elas maior atividade alelopática. Dentro deste bioma destaca-se a família Myrtaceae, sendo que um terço

pertence ao gênero *Eugenia*. Dentre as espécies pertencentes a esse gênero encontra-se a *Eugenia florida*, popularmente conhecida como pitanga-do-cerrado.

Seus órgãos vegetativos possuem em sua caracterização química a presença de metabólitos como compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos (BASTOS et al., 2016). Há relatos da bioatividade desses compostos no processo germinativo e no crescimento inicial de plantas, os quais podem provocar alterações no metabolismo celular, comprometendo o crescimento desenvolvimento da planta (PAULA et al., 2015; FILHO et al., 2017). Entretanto, a atividade dessa planta ainda não foi verificada.

Vale sinalizar que método de extração e a posição das folhas coletadas, são escolhas que podem influenciar na atividade do extrato produzido. De acordo com Neto e Lopes (2006), a variação na intensidade e na quantidade de incidência luminosa nas folhas das árvores são fatores que influenciam a anatomia, a qualidade e a quantidade de metabólitos produzidos pela planta. Ainda, a escolha do método de extração tende a alterar o tipo e a qualidade do composto extraído.

O uso de biotestes vegetais como *Lactuca sativa* (alface) vem sendo amplamente utilizados na investigação da atividade alelopática de extratos vegetais com foco na produção de produtos naturais (NOGUEIRA et al., 2018). A *L. sativa* é amplamente utilizada pois apresenta alta sensibilidade aos aleloquímicos mesmo em baixas concentrações, além de proporcionar a análise de diversos parâmetros como a germinação, crescimento inicial e o ciclo celular, demonstrando baixo custo e resultados rápidos de pesquisa (GRISI et al., 2011; SANTOS et al., 2018).

De acordo com a literatura, até o presente momento não há pesquisas que evidenciem o efeito alelopático e da citogenotoxicidade de extratos de folhas de *E. florida*. Nesse sentido, determinar os efeitos alelopáticos bem como a capacidade desses extratos em gerar modificações no DNA e na fisiologia de outras plantas, nos permite contribuir na produção de produtos naturais menos agressivos, eficientes e de baixo custo. Permite ainda, subsidiar estudos sobre os processos de interações ecológicas dessa planta com outras.

Diante do exposto acima, o trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito alelopático e citogenotóxico de extratos foliares de *E. florida* submetida a diferentes métodos de extração e posição foliar em bioensaios com *L. sativa* L.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta e Moagem

As folhas da espécie *E. florida* foram coletadas em fevereiro de 2018, no sul do Estado de Minas Gerais. As folhas foram coletadas conforme suas exposições, as folhas localizadas na periferia da copa estão nesse artigo sob a sigla FP enquanto as folhas coletadas no interior da copa foram utilizadas a sigla FI. As folhas foram secas em estufa de circulação de ar forçada 45°C, até a obtenção de peso constante. Posteriormente, as folhas foram pulverizadas em moinho industrial, e armazenados em frascos de vidro âmbar até o preparo dos extratos como descritos a seguir.

### Preparação dos extratos

O extrato aquoso foi obtido pelo método de decocção sendo utilizado 50g de folhas pulverizadas em 350 mL de água destilada (FARMACOPÉIA; 2010). O material foi aquecido na temperatura de 100°C por 15min e, após repouso por 30 min, a solução foi filtrada. Posteriormente, foram congeladas e submetidas ao processo de liofilização.

O extrato hidroetanólico foi obtido pelo método de percolação simples, segundo Silva (2017). Logo após os extratos foram concentrados em rotaevaporador, a temperatura de 40°C. A partir da determinação do teor de sólidos totais foi averiguada a necessidade da adição do adjuvante para a secagem dos extratos em spray dryer. No presente estudo, os extratos concentrados com extração hidroetanólica foram acrescidos dos adjuvantes de secagem (aerosil) nas proporções de 50 e 100 % sobre o teor de sólidos. Posteriormente, foram submetidos à secagem pelo Mini Spray Dryer BÜCHI B-290. Os parâmetros de operação foram: a) Temperatura de entrada: (140°C); b) Temperatura de saída: (78°C); d) Fluxo de ar: (30m<sup>3</sup>/h) e) Fluxo da bomba de alimentação: (10%); f) Aspirador: (61%).

Todos os extratos secos foram armazenados a vácuo até o momento do uso, quando foram preparadas soluções estoque de 40mg/mL de cada extrato em água destilada. Foram efetuadas diluições das soluções estoque, obtendo as concentrações de 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL para cada extrato. Para os extratos hidroetanólicos foi realizado um cálculo de correção, devido ao uso de aerosil, considerando os sólidos totais de cada extrato.

### **Características físico-química**

#### **Determinação dos sólidos totais para secagem dos extratos em spray dryer.**

Foi obtida a massa inicial da solução extrativa que posteriormente foi seca em 100°C até obtenção de peso constante. O teor de sólidos foi calculado através da porcentagem de massa final. Os resultados foram expressos pela média de três determinações (SOUZA, 2017).

#### **Determinação do pH e potencial osmótico**

O pH dos diferentes extratos na maior concentração testada foi aferido com auxílio de pHmetro. A determinação da influência do potencial osmótico dos extratos, foi averiguada com o auxílio do osmômetro- Advanced Instruments, modelo 3320, onde foi aferida apenas a maior concentração (40 mg/mL).

#### **Triagem Fitoquímica Preliminar**

Os extratos de cada tratamento foram submetidos a testes fitoquímicos qualitativos realizados por cromatografia em camada delgada, utilizando para fins comparativos de marcadores químicos, aplicados em amostras com 10 µL, em placas cromatográficas de sílica gel F254 (MACHEREY-NAGEL®) usando os reveladores: NP-PEG, cloreto félico, dragendorff, KOH – 5%, NaOH – 8% e luz ultravioleta. Nas análises foram usados os seguintes padrões: rutina, quercetina, ácido gálico, pilocarpina, quinino, atropina, padrão de antraquinona e cumarinas.

#### **Bioensaio de Germinação**

O teste de germinação foi feito de acordo com Nogueira et al (2017) com adaptações, utilizando 3 repetições com 30 sementes distribuídas em placas de petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel germiteste e umedecidas com 3mL de solução nas diferentes concentrações de cada extrato e água

destilada no grupo controle. O bioensaio foi conduzido em câmara de germinação tipo BOD, a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Foram realizadas observações a cada 4 horas, anotando-se o número de sementes germinadas em cada tratamento para o cálculo e do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme proposto por Maguire (1962). No sétimo dia de avaliação foi determinado o número de plântulas anormais (NPA) para as plântulas que apresentavam alguma deformidade na raiz e/ou na parte aérea. Todo material contido nas placas foi pesado compondo a biomassa fresca (BF). O alongamento de raiz (AR) e comprimento de parte aérea (CPA) foi mensurado a partir de 10 plântulas selecionadas aleatoriamente, sendo as medidas realizadas no sétimo dia de germinação com o auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS® 150mm). O material foi levado para estufa a 40°C com circulação de ar por 7 dias para secagem para obtenção da biomassa seca (BS).

### **Bioensaio de Citotoxicidade**

Nas avaliações de citogenotoxicidade, as sementes de *L. sativa* foram colocadas nas mesmas condições descritas anteriormente, após a protrusão radicular foram coletadas as pontas de raiz. Posteriormente, foram fixadas em Carnoy e armazenadas a -18°C (NOGUEIRA, 2014). Após 24 horas o Carnoy foi trocado e então confeccionadas as lâminas citológicas pelo método de esmagamento (RIBEIRO et al., 2012). Para determinação do índice mitótico (IM) foram analisados o número de interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase na finalidade de determinar o efeito dos diferentes extratos sobre o ciclo celular. Foram avaliadas 6000 células por tratamento, conforme descrito por Pizzaria et al., (2019). Quanto a frequência de anormalidades cromossômicas, foram avaliados micronúcleos, ponte em anáfase, ponte em telófase, c- metáfase, stickinis e cromossomo perdido.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições em esquema fatorial 4x6 sendo os fatores extrato (folha do interior da copa aquosa FIA, folha da periferia da copa aquosa, FPA; folha do interior da copa hidroetanólica, FIH; folha da periferia da copa hidroetanólica FPH) e concentrações (2.5; 5; 10; 20; 40 mg/mL e água destilada para o grupo controle). Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA, e a comparação das médias foram feitas por meio do teste de

Scott knott a 5% de significância para os extratos. Para as concentrações foi ajustado o modelo de regressão a 5 % de significância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Caracterização físico química**

A variação observada no potencial osmótico e no pH dos extratos utilizados (tabela suplementar 1) mostram que os valores apresentados não são capazes de exercer influência sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Assim, os efeitos prejudiciais encontrados no experimento são decorrentes à presença de substâncias bioativas. Segundo Grisi et al (2012), potenciais osmóticos abaixo de -0,3Mpa não interferem na germinação de sementes ou no crescimento inicial de plântulas. Ainda, Pinto e Kolb (2015), ressaltam que os efeitos do pH sobre testes alelopáticos são verificados apenas por pHs abaixo de 3 e acima de 11.

### **Determinação de teores sólidos**

A secagem dos extratos (FPH e FIH) secos por spray dryer sobre a utilização de adjuvantes de secagem (aerosil) permitiu verificar os valores de 2.1 e 4.0 g de sólidos totais (tabela suplementar 2). A variação observada entre os valores utilizados (tabela suplementar 3) nos testes de fitotoxicidade e citotoxicidade não resultam interação nos parâmetros avaliados.

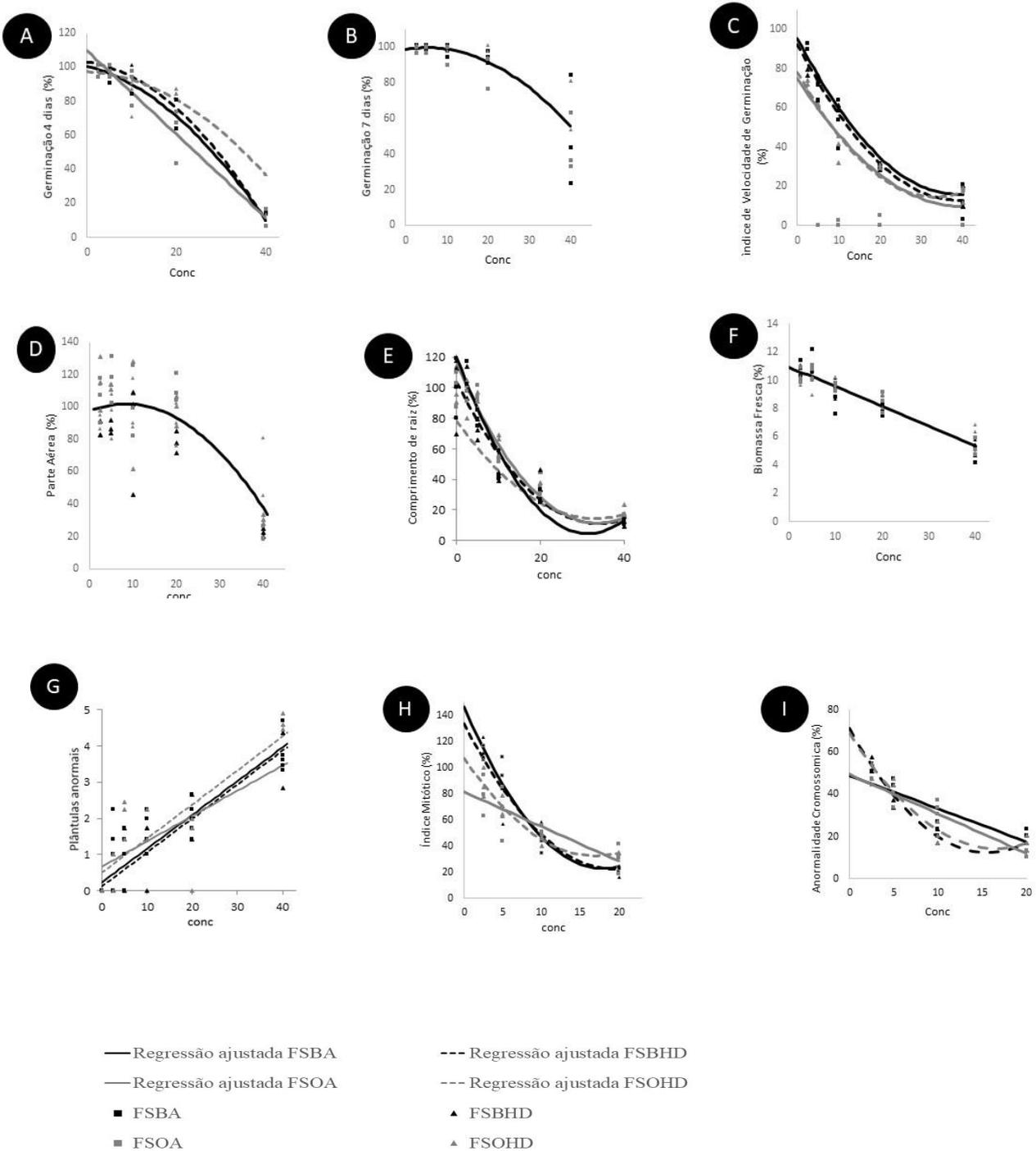
O uso de adjuvante para a secagem de extratos em spray dryer é crucial para um melhor rendimento da amostra, além de melhorar as características físico-química do extrato (CAVALCANTE, 2018). De acordo com Vasconcelos (2005), o aerosil é um dos adjuvantes que apresenta a maior adequabilidade quanto à estabilidade dos extratos secos.

### **Bioensaios de fitotoxicidade e citogenotoxicidade**

Os quatro extratos avaliados mostraram influência negativa na germinação e no crescimento inicial das plântulas de alface, demonstrando potencial alelopático.

Ao comparar a ação dos extratos foliares de *E. florida* no quarto dia nota-se um atraso na germinação das sementes de alface, mostrando que quanto maior a concentração maior o efeito sobre a planta, apresentam ainda, interação significativa entre os extratos (figura1, A). No entanto, no sétimo dia,

os extratos ainda atuam de modo concentração dependente, mas nota-se que as sementes apresentaram mecanismos de superação da toxicidade do extrato, sendo capaz de retomar a germinação. Nas menores concentrações os valores são próximos à 100% de germinação. Entretanto, ao verificar a interferência das amostras sobre o IVG observou-se uma porcentagem de inibição significativamente maior que os demais parâmetros. Nota-se ainda que os extratos permanecem dose dependente (figura.1, C)



**Figura 1:** Relação entre as concentrações dos extratos FIA, FPA, FIH, FPH e a porcentagem de germinação em relação a Germinação 4 dias (A), Germinação 7 dias, IVG (C), CPA (D), AR (E), BF (F), PA (G), IM (H), AC (I). Modelo de regressão ajustado a 5% de significância. As equações estão dispostas no material suplementar.

De acordo com diversos testes de vigor de sementes, a germinação é um dos parâmetros menos afetados, demonstrando menores precisões de resultado. Entretanto, o IVG apresenta na maioria das vezes maiores variações, sendo um parâmetro de grande relevância nos testes germinativos (RODRIGUES et al., 2019). Para Imatomi (2015), a porcentagem de germinação de sementes de alface é o parâmetro menos afetado pela ação de extratos de plantas pertencentes à família myrtaceae. Pereira et al (2018), confirmam que geralmente o efeito alelopático é maior sobre o crescimento de plântulas do que sobre sua germinação.

A redução na velocidade de germinação está diretamente relacionada a alterações dos processos fisiológicas da semente, a partir da interferência dos metabólitos alelopáticos na fase I e II da germinação. Nessas fases ocorre a reativação das enzimas mitocondriais do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, sendo esses processos os responsáveis pela produção de energia da célula. Acontece ainda, a síntese proteica a partir de substratos (enzimas, RNAt, ribossomos, RNAm etc.) presentes na semente madura. Assim, quando a semente é exposta a determinados aleloquímicos todas as sínteses podem ser alteradas comprometendo todo o funcionamento celular (BEWLEY et al., 2013)

Ao analisar o comportamento dos extratos sobre as concentrações constata-se que no quarto dia de condição experimental a maior concentração (40 mg/mL) foi a mais responsiva com destaque nos extratos FIA, FIH e FPA, os quais não se diferem entre si (tabela 4). No entanto, no último dia de condição experimental (7º dia) foi possível verificar que não há uma interação significativa entre os extratos e as concentrações. Comprovando que a longo prazo não há diferença entre os extratos testados.

Quanto ao comportamento dos extratos sobre a velocidade germinativa das sementes (Tabela 4), nota-se que se diferem apenas nas concentrações de 2,5 e 10 mg/mL, sendo nessas os extratos FPA, FPH os mais tóxicos para as sementes testadas. Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como flavonóides,

taninos e antocianinas (NETO e LOPES, 2006). Possivelmente as folhas mais expostas ao sol obtiveram uma tendência maior na produção desses metabólitos, conferindo efeito mais evidente em concentrações mais baixas. No entanto, essa aferição só pode ser confirmada a partir de análises qualitativas. Para as maiores concentrações (20, 40 mg/mL) onde a atividade tóxica foi mais responsiva, não houve diferença entre os extratos.

Assim, no presente estudo é possível sinalizar que os aleloquímicos presentes na planta *E. florida* interferem diretamente no processo de germinação, evidenciando modificações no IVG, no 4º e no 7º dia de condição experimental, apresentando redução do número de sementes germinadas com o aumento da concentração. Porém, o atraso na velocidade germinativa das sementes é o parâmetro mais evidente. De acordo com Gusman et al (2008), as mudanças nos padrões de germinação podem ser resultado de vários efeitos à níveis primários. Entre eles, podem ser citados a transcrição e tradução do RNA; a respiração, por sequestro de oxigênio (fenóis); a conformação de enzimas e de receptores, ou ainda pela combinação de todos esses fatores.

Após as alterações fisiológicas, a morfologia dessas plantas também é modificada, expressando alterações fenotípicas, como mudanças no seu crescimento e desenvolvimento. Plantas que germinam lentamente podem ser reduzidas em altura (GRISI et al., 2013; GOMES et al., 2019) e, conseqüentemente, podem ser mais suscetíveis ao estresse e à predação.

**Tabela 1:** Análise do comportamento dos diferentes extratos dentro das concentrações. As letras minúsculas diferem dentro das concentrações pelo teste de Scott knott a 5% de significância.

Extrato	Concentrações mg/ mL				
	2,5	5	10	20	40
<b>Germinação 4 dias</b>					
FIA	101a	92a	92a	86a	35a
FIH	101a	98a	97a	74b	10b
FPA	98 a	97a	89a	70b	10b
FPH	98 a	98a	83a	61b	10b
<b>Índice de velocidade de germinação</b>					
FIA	90a	74a	59a	30a	11a
FIH	80b	67a	52a	29a	13a
FPA	71c	66a	45b	24a	9a
FPH	61d	60a	39b	28a	16a
<b>Alongamento de Raiz</b>					
FIA	112a	95a	63a	42a	11a
FIA	101b	91a	54a	37a	12a

FIH	96 b	80b	47b	31b	14a
FPA	92 b	72b	41b	28b	19a
FPH	<b>Plântulas anormais</b>				
FIA	0,8a	2a	1,2a	2,3a	3,8a
FIH	0 a	1b	1,1a	1,9a	3,8a
FPA	1,4a	1b	1,7a	1,7a	3,5a
FPH	0,6a	0,3	1,6a	1,2a	4,6a
	<b>Índice mitótico</b>				
FIA	114a	95a	42a	25a	*
FIH	109a	70b	55a	21a	*
FPA	87b	68b	50a	30a	*
FPH	78b	66b	45a	34a	*
	<b>Anormalidades cromossômicas</b>				
FIA	49a	41a	33a	21a	*
FIH	54a	38a	23b	16a	*
FPA	46a	36a	21b	16a	*
FPH	51a	44a	20b	11b	*

Legenda: Análise do comportamento dos diferentes extratos dentro das concentrações. As letras minúsculas diferem dentro das concentrações pelo teste de Scott knott a 5% de significância.

Nas análises relacionadas ao crescimento inicial, o comprimento da raiz (CR) foi mais afetado pelos extratos do que o comprimento da parte aérea (CPA), demonstrando efeito significativamente tóxico na maior concentração testada em todos os extratos (40mg/mL). De acordo com a literatura (TANVEER et al., 2012; GRISI et al., 2015; GOMES et al., 2019), a raiz é geralmente o órgão mais afetado pelos aleloquímicos quando comparado a parte aérea. A dificuldade do crescimento do eixo radicular das sementes se dá decorrente a absorção de fitotoxinas presentes nos extratos, pelos tecidos radiculares, tal evento pode ter sido favorecido pelo contato físico da raiz com o papel filtro, o qual continha os extratos (GRISI et al., 2011). De acordo com a literatura, a bioatividade dos extratos está condicionada à capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação de seus compostos potencialmente alelopáticos (ANESE et al., 2016).

Para o parâmetro CPA fica evidente que os extratos atuam de maneira dose dependente, com uma redução significativa na maior concentração testada (figura 1, D). Ao averiguar o comportamento do material e concentração, nota-se que o extrato FIA foi o mais responsivo, quando comparado aos demais extratos.

Segundo o estudo realizado com Hüller e Schock (2011), ao testarem extrato aquoso de *E. involucrata* (cerejeira-do-mato), também observaram inibição no crescimento radicular de alface. De

maneira geral pode ser concluído que os extratos interferem na germinação e no crescimento inicial das plântulas alvo, sendo verificado efeito alelopático mais evidente no IVG e crescimento inicial das plântulas do que na porcentagem final de sementes germinadas.

A inibição do crescimento da plântula pode se dar decorrente a presença de determinados aleloquímicos como os polifenóis e taninos, os quais foram detectados em todos os extratos testados (material suplementar). Ambos podem se ligar ao ácido giberelínico (GA) comprometendo o desenvolvimento do vegetal. Esse hormônio é responsável pela indução da síntese de novos tecidos na fase II da germinação, atuando como ativador primário na cascata de sinais, que culmina com a indução de um fator de transcrição e a expressão gênica das enzimas amilolíticas (BUCKERIDGE et al., 2004). Todos esses processos exibem grande importância na fase III da germinação, sendo esse o responsável pelo crescimento do eixo embrionário. Quando determinado aleloquímico se liga a esse hormônio a germinação e o crescimento do embrião podem ser comprometidos (PASSOS et al., 2004).

Ainda, a presença de metabólitos como antraquinonas, triterpenos, saponinas e taninos presentes nos extratos testados (material suplementar) sinaliza influência no crescimento e desenvolvimento da planta-alvo. Essas substâncias são capazes de agir isoladamente ou sinergicamente em diferentes rotas metabólicas, provocando respostas tóxicas a planta (PAULA et al., 2015; FILHO et al., 2016).

Quanto ao método de extração e posição foliar não foi detectado diferença estatística para o parâmetro AR na maior concentração testada (40 mg/mL), sendo essa a mais responsiva. Com relação ao CPA os extratos não demonstram diferença estatística em nenhuma das concentrações. As análises referentes ao número de PA mostram que apenas a concentração de 5 mg/mL apresenta diferença estatística. Não demonstrando diferença entre os extratos em nenhuma das demais concentrações.

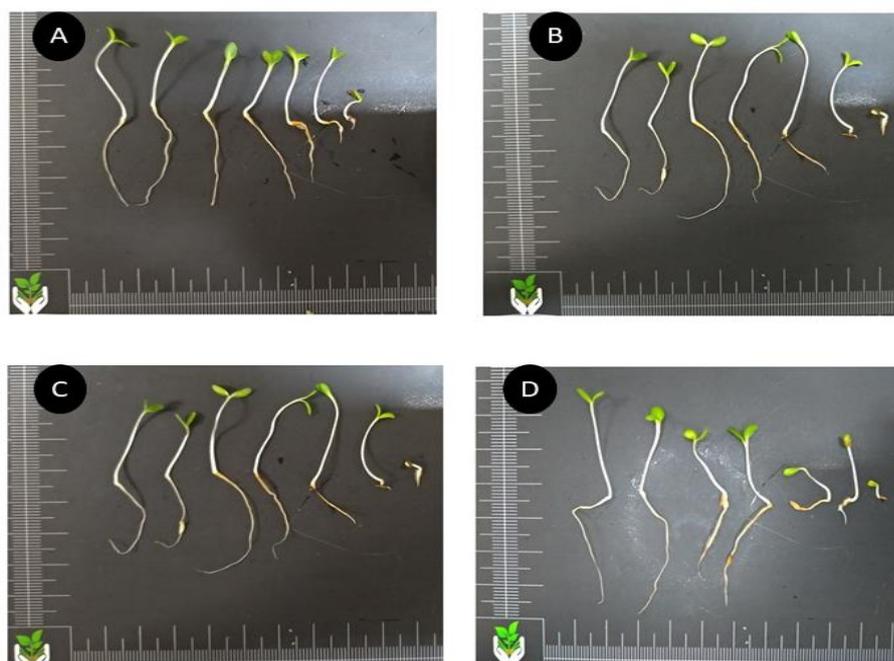
Nessa perspectiva, é possível afirmar que a produção dos extratos pode ser realizada com as folhas mais expandidas, ou seja, as do interior da copa, no ato da coleta, o que simboliza maior

rendimento do extrato. E ainda, ser realizado o método de extração aquoso, sendo essa a forma mais rápida de extração, além de apresentarem baixo custo e fácil produção.

Alterações nos aspectos morfológicos das plântulas como, o atrofiamento, necrose e outras alterações nas raízes e parte aérea, são resultados promovidos pelas alterações nas rotas metabólicas das plântulas. Macroscopicamente no experimento foi identificado o aparecimento de raízes escurecidas, frágeis e com geotropismo alterado. Segundo Cruz-Ortega (1998), tais disfunções se dão em resposta a ação das substâncias tóxicas presentes nos extratos.

A presença de necrose e redução do tamanho das raízes encontrados no experimento pode estar associada à ação das saponinas presentes nos extratos (SOARES e VIEIRA, 2000; GRISI et al., 2011). As saponinas afetam principalmente os parâmetros de germinação e crescimento inicial, pois reduzem a difusão de oxigênio através do revestimento da semente (MARCHAIM et al., 1974). Ainda, a presença de raízes retorcidas pode se dar devido à interferência dos compostos no metabolismo das auxinas (GINDRI, 2018). Esse hormônio é responsável por controlar a curvatura geotrópica da raiz, quando reduzidos podem provocar indução e inversão gravitropica (ALONI et al., 2006). Na figura 3, estão ilustradas as imagens das plântulas no sétimo dia de condição experimental.

**Figura 3:** Plântulas de alface exposta à diferentes concentrações dos diferentes extratos testados

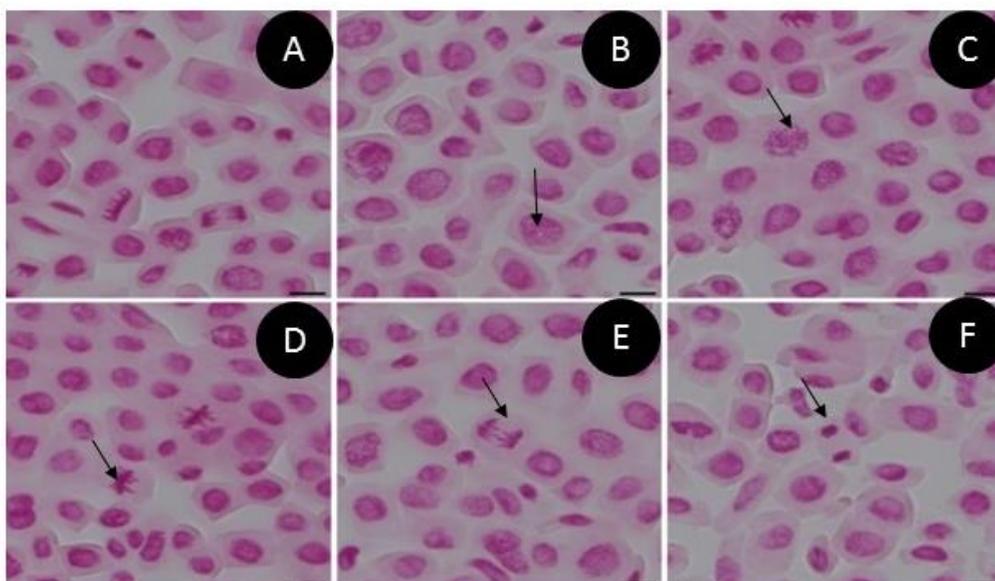


Legenda: As letras mostram os extratos testados, **A-** FPA, **B-** FIA, **C-** FIH, **D-**FPH. Da direita para a esquerda estão representadas da menor para a maior concentração, sendo as plântulas iniciais representadas pelo controle de água e controle de aerosil.

Para o parâmetro biomassa fresca (BF) as plântulas demonstraram redução de peso de modo dependente ao aumento da concentração, quando expostas aos extratos por sete dias. Provavelmente essa redução está relacionada com a quantidade de água absorvida nos tecidos vegetais. Plantas expostas a substâncias potencialmente tóxicas desenvolvem mecanismos de defesa capazes de dificultar a absorção de água. Entretanto, a interação entre os extratos e as concentrações não foi significativa com  $p>0,05$ . Em relação à biomassa seca, não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos extratos.

Análise do ciclo celular sobre a ação de todos os extratos em sementes de *L. sativa* permitiu verificar que a redução do índice mitótico foi decorrente ao aumento da concentração, (figura1, H). Os dados indicam que nas duas maiores concentrações avaliadas (10, 20 mg/mL) não houve diferença entre os extratos avaliados para nenhuma das amostras (tabela 4).

**Figura 4:** Fases da divisão celular utilizadas para a avaliação do índice mitótico



Legenda: (A) Todas as fases do ciclo celular, (B) interfase, (C) Prófase (D) Metáfase (E) anáfase (F) telófase.

O alongamento de raiz se dá em consequência de dois fatores, expansão ou divisão celular. Com isso, nota-se nesse experimento a grande influência da divisão celular no alongamento da raiz. Pois as

maiores concentrações testadas são marcadas pela redução do crescimento radicular, seguidas de baixa divisão mitótica. Resultados semelhantes foram encontrados por Guarda, 2017, Nogueira, 2020. De acordo com a literatura, a proliferação da atividade mitótica é marcada pela fase III da germinação, a qual proporciona como resultado a protrusão da raiz primária

Quanto ao aparecimento de anormalidades cromossômicas (AC) foram identificadas, ponte em anáfase, ponte em telófase, stickines, cromossomo perdido e c-metáfase. A maior frequência de anormalidades foi observada na concentração de 2,5 mg/mL, sendo o aparecimento de stickines e ponte em anáfase os mais frequentes (figura 1, H). Ao averiguar o comportamento dos diferentes extratos, nota-se que nas concentrações de 2,5 e 5 mg/mL não há diferença entre eles, sendo essas concentrações as responsáveis pelo maior índice de anormalidade. A redução do número de anormalidades cromossômicas nas maiores concentrações ocorre, pois, a taxa de divisão celular é baixa, sendo assim, poucas anormalidades são observadas uma vez que praticamente todas as anormalidades avaliadas são observadas em alguma das fases da divisão celular. Entretanto, o aumento do número de anormalidades cromossômicas na menor concentração testada pode ser explicado devido à queda do índice mitótico nas maiores concentrações.

Alterações cromossômicas como pontes e fragmentos cromossômicos indicam mecanismo de ação clastogênico dos extratos testados com alguma atividade relacionada à genotoxicidade (ação na estrutura do DNA). Já o aparecimento de anormalidades como cromossomos perdidos e as C-metáfases estão relacionadas ao mecanismo de ação aneugênico decorrente de um efeito citotóxico da substância testada nas proteínas (LEME e MARIN, 2009; RIBEIRO, 2018). Neste caso, os extratos de *E. florida* apresentaram modo de ação misto (aneugênico e clastogênico).

## CONCLUSÕES

Os quatro extratos avaliados possuem ação alelopática e fitotóxica evidenciada principalmente nas maiores concentrações, ou seja, provocam redução na germinação e no crescimento inicial das plântulas de alface. Para os parâmetros IVG, AR e CPA na maior concentração (40 mg/mL) não há diferença entre os extratos testados. Os extratos provocaram além dos efeitos fisiológicos, grandes

alterações na morfologia das plântulas testadas, demonstrando sua atividade pós emergente. Quanto as análises citogenéticas, os quatro extratos apresentaram influência sobre o ciclo celular das sementes de alface, reduzindo o índice mitótico e o aparecimento de anormalidades cromossômicas diante do aumento da concentração.

Por fim, a pesquisa permite concluir que os extratos da espécie *E. florida* apresentam atividade tóxica, causando efeitos no processo pré-emergente e pós-emergente da plântula. A princípio seu uso é uma boa opção de controle para os pequenos agricultores, que buscam medidas práticas e de baixo custo. Podendo ainda, vir a ser alvo de estudo para futuros produtos eficientes e menos agressivos ao meio ambiente.

#### **AGRADECIMENTOS:**

Os autores agradecem a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), à CAPES à FAPEMIG, e ao CNPq. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### **REFERENCIAS**

- ARAUJO, L. L. N. **Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *tetradenia riparia* (hochst) codd- lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento.** de 2014. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) Universidade Federal de Goiás, UFG, 81p.
- ANESE, S. et al. 2016. Fitotoxicidade de extratos etanólicos de frutos e folhas de *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates sobre o crescimento de plantas daninhas. **Biotemas**, 29 (): 1-10.
- BASTOS, R. G. et al. 2016. Chemical Characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia florida* DC (Myrtaceae) leaves. **Int J. Pharm Sci**, 8:110-115.
- BEWLEY, J. et al. 2013. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy.** Third. 3 ed, p. 133-188.
- CAVALCANTE, U.L.A; JOSÉ, O. R; GALDINO, S.M. 2018. Allelopathic effects of plant extracts of *Hancornia speciosa* Gomes on germination of *Lactuca sativa* L. **Revista Fitos**, Brasil, 12(2):147-1604.

- CRUZ, O. R. et al. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyios deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* e *Curcubita ficifolia*. 1998. **Journal of Chemical Ecology**, 24 (12):2039-2057.
- FERREIRA, A. G. et al.2004. **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Jones e Bartlett, ed.1 cap.16. 251-262p.
- FILHO, A. J. C et al. Triterpenoides, fenólicos e Efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC. (myrtaceae).2017. **Quím. Nova**. 40 (3): 252-259.
- GRISI, P.U. et al. 2015. Phytotoxicity and Identification of Secondary Metabolites of *Sapindus saponaria* L. leaf extract. **Journal of Plant Growth Regulation**. 34: 339- 349.
- GRISI, P. U. et al. 2011. Allelopathic effect of *Sapindus saponaria* fruit on germination and seedlings morphology of weed and vegetables. **Planta daninha**, 29 (2): 311-322.
- GINDRI, D.M. de 2018. **Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Função da ação Alelopática de *Lantana Camara* L. na Germinação de Sementes e *Bidens Pilosa* L. e *Avena Sativa* L.** Tese de doutorado (Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina, UESC, 101p.
- GINDRI, D.M; COELHO, C.M. M. Allelochemical Metabolites Of *Lantana Camara* L.: Potential For the Development of Bioherbicide.2020. **Revista Técnico-Científica do CREA**. 24 (1): 1-18.
- GUARDA, A.et al. Atividade Alelopática e Citotóxica do extrato aquoso de *Punica granatus* (Lytharceae).2017. **Scientia Amazonia**, 6 (3):46-52.
- GRISI, P.U. et al. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de Plantas Daninhas. 2013. **Planta Daninha**, 31 (2):239-248.
- GUSMAN, G. S. et. al. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas.2008. **Acta Scientiarum**, 30 (2): 119-125.
- HULLER, A.; SCHOCK, A. A. Avaliação do Potencial Alelopático de três espécies de *Eugenia*. (myrtaceae) sobre o processo germinativo de *lactuca sativa* L.2011. **Revista de Ciências Ambientais**, 5 (1): 25- 37.
- IMATOMI, M. et al. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds.2015. **Acta Scientiarum Agronomy**, 37(2): 241-248.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test environmental monitoring: A Review on its application.2009. **Mutation Research**. 682 (1): 71-81.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor.1962. **Crop Science**. 2 (1):176-177.

MORAES.R.M. et al. Effects of hydrogen peroxide on initial growth and enzymatic antioxidant system of *Lactuca sativa* L. (Asteraceae).2018. **Pakistan Journal of Botany**, 50 (5):1769-1774.

NETO L.G; LOPES N. P. Fatores de Influência no conteúdo de metabolitos secundários.2006. **Quím. Nova**, 30 (2): 374-381.

NOGUEIRA, M. L. **Fitotoxicidade e Citotoxicidade de extratos de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) em *Lactuca sativa* L.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, 65p.

NOGUEIRA, M. L et al. Allelopathic effects of Aqueous and Ethanolic leaves extracts of *Schinus molle* L. under different kinds of pruning.2017. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 7: 169-177.

OLIVEIRA, M. F. de; BRIGHENTI, A. M. **Controle de Plantas Daninhas Métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia.** 2018. Alelopatia: Potencialidades do seu uso no controle do mato. Brasília: Embrapa, 169p.

PAULA, C. et al. Estudo do Potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface.2015. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 1 (4): 577-584.

PASSOS, I. R.S, et al. Utilização do Ácido Giberélico para a quebra de dormência de Sementes de *Passiflora nitida kunth* germinadas in vitro.2004. **Rev. Bras. Frutic**, 26(2): 380-381.

PINTO, G; KOLB, R. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of neotropical savanna.2016. **Botany**, 94 (2): 81–89.

PIZZAIA, D. et al. Cadmium toxicity and its relationship with disturbances in the Cytoskeleton, cell cycle and chromosome stability.2019. **Ecotoxicology**. 28(9): 1046-1055.

RIBEIRO, L.R. et al. Avaliação Da Atividade Citogenotóxica E Antimutagênica do extrato Aquoso de *Bidens Pilosa*. 2018. **Conexão Ci**, 13 (4): 15-22.

RIBEIRO, L.R et al. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão (*Stryphnodendron adstringen* (mart Coville) em bioensaios com alface. 2012. **Revista Brasileira de Biociências**, 10 (2):220-225.

RODRIGUES, M. R, et al. Respiratory Activity as Vigor test in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. 2019. **Diversitas Jornal**, 4 (3): 1070-1081.

SAUSEN, D.et al. Biotechnology Applied to weed Management. 2020 **Brazilian Journal of Development**, 6 (5):23150.

SANTOS, P.F. P. et al. Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* DC. (myrtaceae) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential.2018. **Quím Nova**, .41(10): 140-1149.

SILVA, C.P. et al. Plants Extract from Cerrado Sul-Matogrossense with Bioherbicide and Bioinsectice Potential.2017. **Uniciências**, 21(1): 25-34.

SOUZA, C. R.F. **Produção de extratos secos Padronizados de plantas medicinais Brasileiras: Estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro.** de 2017. Tese de Doutorado Faculdade de Ciências farmacêutica de Ribeirão Preto, USP, 219 p.

SOARES, G. L. G.; VIEIRA, T. R. Inibição da Germinação e do Crescimento radicular de alface (cv.Grand Rapids) por extratos aquosos de Cinco Espécies de *Gleicheniaceae*.2000. **Flor. Amb**, 7 (1): 180-197.

TANVEER, A. et al. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* L. on germination and seedling growth of chickpea and wheat.2012. **Chilean Journal of Agricultural Research**,72 (4) :495-501.

VASCONCELOS, E.A.F. et al.; Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae).2005. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(3): 243-249.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

## ANEXO 1- TABELA DOS VALORES DE PH E POTENCIAL OSMÔTICO

Extrato	pH	Potencial Osmótico (Mpa)
FPA	4,71	-0,297
FPH	4,3	-0,174
FIA	4,3	-0,299
FIH	4,1	-0,177
ÁGUA	7,0	0

ANEXO 2- Valores dos sólidos totais (g) obtidos por secagem (100°C) dos extratos hidroetanólicos 70% das folhas (periferia e interior da copa) de *E. Florida*.

Extrato	Peso	Peso Final	Proporções
	<b>1</b>	0,2	
<i>FPD</i>	<b>2</b>	0,2	0,21
	<b>3</b>	0,25	
	<b>1</b>	0,4	
<i>FIH</i>	<b>2</b>	0,4	0,4
	<b>3</b>	0,4	

ANEXO 3- Análise por cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos (FIA) folhas de sombra aquosa; (FPA) folhas de sol aquosa; (FIH) folhas de sombra hidroetanólica; (FPH) folhas de sol hidroetanólica da espécie *E. florida*. O sinal (+) indica à presença e (-) ausência do composto testado.

<u>Extratos</u>	<u>Flavonoides</u>	<u>Fenóis</u>	<u>Alcaloides</u>	<u>Taninos</u>	<u>Catequina</u>	<u>Saponinas</u>	<u>Terpenos</u>	<u>Antraquinonas</u>
FSOA	+	+	-	+	+	+	+	-
FSBA	+	+	-	+	+	+	+	-
FSOHD	+	+	-	+	+	+	+	-
FSBHD	+	+	-	+	+	+	+	-

Legenda: (FSBA) folhas de sombra aquosa; (FSOA) folhas de sol aquosa; (FSBHD) folhas de sombra hidroetanólica; (FSOHD) folhas de sol hidroetanólica.

## ANEXO 4- ANÁLISES DAS REGRESSÕES

	FIA	FIH	FPA	FPH
IVG	$Y=95,4028-4,7529X+0,0668X^2$ $R^2=0.970020$	$Y=92,365-4,0942X+0,0527X^2$ $R^2=0.994696$	$Y=74,8965-3,2747X+0,0411X^2$ $R^2=0.961311$	$y=78,3207-3,8315x+0,0574x^2$ $R^2=0.972224$
AR	$y=119,8302-7,3333x+0,1167x^2$ $R^2=0.949841$	$y=103,5362-5,4665x+0,0808x^2$ $R^2=0.892100$	$y=115,2478-6,1757x+0,0918x^2$ $R^2=0.970046$	$y=105,6809-4,2905x+0,0535x^2$ $R^2=0.982964$
4 dias	$y=100,7711-0,6931x-0,0393x^2$ $R^2=0.994878$	$y=103,0183-0,3693x-0,0490x^2$ $R^2=0.997279$	$y=109,6910-2,4520x$ $R^2=0.991514$	$y=97,3562-0,1116x-0,0351x^2$ $R^2=0.950130$
IM	$Y=146,5145-13,8113X+0,3855X^2$ $R^2=0.979992$	$Y=133,3551-11,3792X+0,2915X^2$ $R^2=0.938428$	$Y=81,4510-2,6496X$ $R^2=0.965919$	$Y=107,5739-8,8412X+0,2601X^2$ $R^2=0.999007$
PA	$y=98,3826+0,9519x-0,0643x^2$ $R^2=0.989732$	NÃO SIGNIFICATIVO		
BF	$y=133,5691-4,9786x+0,0554x^2$ $R^2=0.942521$	$y=117,1518-2,2891x$ $R^2=0.980550$	$y=116,5687-2,2161x$ $R^2=0.974860$	$y=102,6984-0,8502x-0,0197x^2$ $R^2=0.988747$
7 DIAS	$Y=98,7581+0,3821*X-0,0366X^2$ $R^2=0.999363$	NÃO SIGNIFICATIVO		