

**GUSTAVO FRANCISCATTI MECINA**

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICA, FITOTÓXICA E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Tridax procumbens* L.  
(ASTERACEAE). E *Ouratea spectabilis* (MART. EX ENGL.) ENGL. (OCHNACEAE).**

**ASSIS**

**2014**

**GUSTAVO FRANCISCATTI MECINA**

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICA, FITOTÓXICA E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Tridax procumbens* L.  
(ASTERACEAE). E *Ouratea spectabilis* (MART. EX ENGL.) ENGL. (OCHNACEAE).**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador(a): Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca do Instituto Educacional de Assis – I E D A

Mecina, Gustavo Franciscatti  
M486i Investição das atividades alelopática, fitotóxica e antioxidante de extratos e frações de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). e *Ouratea spectabilis* (mart. ex engl.) engl. (Ochnaceae). / Gustavo Franciscatti Mecina. Assis, 2014  
81 f. il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.  
Orientador: Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Aleloquímicos. 2. Antioxidante. 3. Fitotóxicos. 4. Mutagenicidade.  
I. Título.

CDD 632.58

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Marcia, a minha irmã Jaqueline e à minha namorada Michelly, que sempre me deram amor e carinho tornando tudo isso possível...

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, minha irmã e namorada, por sempre estarem ao meu lado. Sem vocês, nada disso seria possível, amo vocês.

Agradeço especialmente ao meu orientador Dr. Regildo Márcio da Silva por acreditar no meu potencial e abrir as portas do seu laboratório me dando liberdade para que eu pudesse aprender processos/métodos que tornaram esse trabalho de mestrado possível. Agradeço pelas discussões/orientações que me fizeram não somente conquistar um sonho, mas que também me fizeram ser a pessoa que sou hoje.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos da Pós-Graduação Kamille, Patrícia, Pâmela, Vanessa e Larissa pelas discussões sobre assuntos pertinentes à vida acadêmica e aos assuntos da vida.

Aos meus amigos de laboratório, Valter, Paulo, Renan, Anibal pelo auxílio nas análises dos experimentos.

A todos os funcionários do departamento de Ciências Biológicas de Assis, que sempre estiveram disponíveis e empenhados para solucionar os assuntos da pesquisa.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação por todos os serviços realizados e dúvidas esclarecidas.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero reconhecimento.

Mecina, Gustavo Franciscatti. **INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICA, FITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Tridax procumbens* L. (ASTERACEAE). E *Ouratea spectabilis* (MART. EX ENGL.) ENGL. (OCHNACEAE).** 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

### RESUMO

Sabe-se que dentro dos diferentes ecossistemas e em culturas de origem antrópica as plantas podem exercer interferência sobre outros vegetais ou microorganismos. Diferentes autores classificam esse evento como atividade alelopática, e esta ocorre principalmente pela liberação de biomoléculas (aleloquímicos), que podem variar sua constituição e classe química dependendo da espécie produtora. Estudos recentes têm demonstrado que os aleloquímicos constituem-se em importantes candidatos com potencial para serem utilizados como praguicidas e herbicidas naturais, transformando-se em aliados para o manejo agroecológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico e antioxidante dos diferentes extratos das folhas de *Tridax procumbens* L., espécie invasora e daninha, e *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl., nativa do cerrado brasileiro, por meio dos bioensaios laboratoriais de pré e pós-emergência em sementes de *Lactuca sativa* L. Além de avaliar o índice mitótico, aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleo em células de raiz de *Allium cepa* L. Adicionalmente, buscou-se determinar a atividade antioxidante e também elucidar fitoquimicamente os componentes fitotóxicos presentes nos extratos destas espécies. No bioensaio de pré-emergência as diferentes concentrações dos diferentes extratos reduziram os índices de germinação tanto para *T. procumbens* quanto para *O. spectabilis* quando comparados com o controle, alterando ainda o tempo médio, velocidade média e sincronismo da germinação. Semelhantemente ao encontrado nos bioensaios de pós-emergência, onde alterações no desenvolvimento de plântulas de alface (radícula e hipocótilo) foram observadas, apresentando inibição do crescimento da raiz principal e do hipocótilo quando comparados com o controle. Quanto ao índice mitótico, foi possível observar que os diferentes extratos das duas espécies provocaram redução quando os mesmos foram comparados com o controle negativo. Apresentaram ainda alterações para os tratamentos com *T. procumbens* nos índices de morte e de mutagenicidade e para *O. spectabilis* nos índices de morte, alterações cromossômicas e de mutagenicidade. Foi identificada por (HPLC-PAD) uma quantidade considerável de compostos flavonoídicos no extrato etanólico e fração acetato de etila de *T. procumbens* e extrato hidroetanólico e fração acetato de etila de *O. spectabilis*. Portanto, foi possível verificar que estas espécies possuem atividade fitotóxica possivelmente causada por compostos aleloquímicos que são capazes de interferir diretamente na estabilização e desenvolvimento de outras espécies, apresentando assim potencial para investigação de moléculas alvo e possível aplicação no desenvolvimento de herbicidas naturais.

Palavras-chaves: Aleloquímicos; Antioxidante; Fitotóxicos; Mutagenicidade

Mecina, Gustavo Franciscatti. **RESEARCH OF ACTIVITY ALLELOPATHIC, PHYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT EXTRACTS AND FRACTIONS OF *Tridax procumbens* L. (ASTERACEAE). AND *Ouratea Spectabilis* (MART. EX ENGL.) ENGL. (OCHNACEAE)** 2014. 81f. Dissertation (Masters in Bioscience). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

#### ABSTRACT

It is known that within the different ecosystems and cultures of anthropogenic origin the plants can exercise interference on other plants or microorganisms. Different authors classify this event as allelopathic activity this occurs mainly by the release of biomolecules (allelochemicals) that can vary its constitution and chemical class depending on the producing species. Recent researches have shown that allelochemicals are important candidates with potential to be used as natural pesticides and herbicides, becoming an ally to agroecological management. Thus the aim of this study was to evaluate the phytotoxic and antioxidant potential of different extracts of leaves of *Tridax procumbens* L. invasive and weed species and *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. native to the Brazilian Cerrado through laboratory bioassays pre-and post-emergence in seeds of *Lactuca sativa* L. Besides assessing the mitotic index, chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in root cells of *Allium cepa* L. We also determine the antioxidant activity and the chemical profile of phytotoxic compounds present in the extract of these species. In bioassay of pre-emergence the different concentrations of different extracts reduced the germination rates for both *T. procumbens* how *O. spectabilis* as compared with the control, even changing the average time, average speed and timing of germination. Similarly to that found in bioassays post-emergence, where changes in the development of lettuce seedlings (radicle and hypocotyl) were observed, with inhibition of root growth and hypocotyl compared with the control. Regarding the mitotic index was observed that the different extracts of the two species tested reduced when they were compared to the negative control. Introducing yet changes to the treatments with *T. procumbens* in rates of death and mutagenicity and *O. spectabilis* in the death rate, chromosomal alterations and mutagenicity. Is identified by (HPLC-PAD) a considerable amount of flavonoid compounds in ethanol extract and ethyl acetate fraction of *T. procumbens* and hydroethanolic extract and fraction of ethyl acetate *O. spectabilis*. Therefore we found that these species have phytotoxic activity possibly caused by compounds allelochemicals that are capable of directly interfering in the stabilization and development of other species, thus presenting potential for investigation of target molecules and possible application in the development of natural herbicides.

Keywords: Allelochemicals; Antioxidant; phytotoxic; mutagenicity

## SUMÁRIO

Resumo .....	5
Abstract .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 - Alelopatia .....	9
1.2 - Alelopatia no Cerrado .....	11
1.3 - Espécies Exóticas Invasoras e Alelopatia .....	13
1.4 – Espécies Estudadas .....	15
1.4.1 - <i>Tridax Procumbens</i> L. ....	15
1.4.2 - <i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl. ....	16
<b>2. REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>3. Capítulo 1</b> .....	23
Resumo .....	24
Introdução .....	25
Material e Métodos .....	26
Resultados .....	30
Discussão .....	35
Agradecimentos .....	38
Referências .....	38
<b>4. Capítulo 2</b> .....	42
Resumo .....	43
Introdução .....	44
Material e Métodos .....	45
Resultados .....	49
Discussão .....	54
Agradecimentos .....	57
Referências .....	57
<b>5. Capítulo 3</b> .....	62
Resumo .....	63
Introdução .....	64
Material de Métodos .....	65
Resultados .....	67
Discussão .....	73
Agradecimentos .....	76



Referências .....	76
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Alelopatia

O termo alelopatia é empregado para caracterizar as interações mediadas por biomoléculas existentes entre planta – planta, planta – microrganismos e microrganismo – planta. Foi cunhado por Molisch em 1937 e significa, do grego, *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer. A produção de biomoléculas por plantas e a natureza química dessas substâncias variam entre as espécies, do mesmo modo que a suscetibilidade destas também varia de acordo com a substância química liberada, favorecendo e/ou prejudicando os indivíduos envolvidos, influenciando a composição das comunidades (EINHELLIG, 1999).

No que diz respeito à alelopatia, sabe-se que dentro dos diferentes ecossistemas e em culturas de origem antrópica, as plantas podem exercer interferência sobre outros vegetais ou microrganismos, sendo que esta pode ser favorável ou desfavorável aos indivíduos alvo (ALMEIDA, 1988). Diferentes autores classificam este evento como atividade alelopática e esta ocorre principalmente pela liberação de biomoléculas (aleloquímicos), que podem variar sua constituição e classe química dependendo da espécie produtora (RICE, 1984; INDERJIT, 1996; MAIRESSE et al., 2007). Estudos recentes têm demonstrado que os aleloquímicos constituem-se em importantes candidatos com potencial para serem utilizados como praguicidas e herbicidas naturais. Assim, transformando-se em um aliado para o manejo agroecológico (ALVES et al., 2003; GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005; TESIO et al., 2012).

A intensidade da atividade alelopática depende diretamente da ação dos aleloquímicos e esta é mediada por diversos fatores, tais como concentração, temperatura e outras condições ambientais (MACIAS, 2007). Na maioria das vezes, a ação dos aleloquímicos é dependente da concentração (SILVA e AQUILA, 2006). Os aleloquímicos podem ser encontrados em todas as partes dos vegetais: caule, folhas, raízes, inflorescências, flores, frutos e sementes, e sua liberação no ambiente pode ocorrer de diferentes modos tais como lixiviação foliar, exsudação radicular, decomposição de resíduos e volatilização, podendo variar de acordo com o habitat da planta (CHOU e KUO, 1986; INDERJIT e CALLAWA, 2003).

A alelopatia não pode ser interpretada como um evento contrário à competição por recursos, mas deve-se entender estes dois processos como integrados, podendo estar ocorrendo isoladamente ou não. Indícios do possível potencial alelopático de plantas podem

ser observados através de padrões espaciais no campo, podendo favorecer a escolha da espécie para análises (INDERJIT e CALLAWA, 2003).

Diferentes classes de compostos secundários são caracterizadas como aleloquímicos e constituindo este grupo estão os fenóis, derivados de ácido benzóico e cinâmico, flavonoides, cumarinas, taninos, terpenoides, alcaloides e poliacetilenos (INDERJIT, 1995; VYVYAN, 2002). Entre os aleloquímicos mais estudados estão fenóis, principalmente devido à sua influência na infertilidade de solos; terpenóides são também frequentemente estudados (REIGOSA et al., 1999; MACÍAS et al., 2008).

No que diz respeito à ação dos aleloquímicos, esta pode ocorrer de maneira indireta ou direta (RICE, 1984; FERREIRA e AQUILA, 2000). Entre os efeitos indiretos estão modificações nas propriedades e características nutricionais do solo, que alteram também a atividade e dinâmica das populações. Os efeitos diretos são caracterizados por modificações no crescimento e no metabolismo vegetal, envolvendo alterações em nível celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, síntese proteica, metabolismo lipídico e de ácidos orgânicos, inibição ou estimulação da atividade enzimática específica, efeitos sobre a relação hídrica e sobre a síntese de DNA ou RNA nas plantas alvo. (RIZVI et al., 1992; SILVA e AQUILA, 2006). Esses efeitos podem ocasionar desde uma supressão no processo de germinação até influenciar na instalação e fixação da plântula no ambiente (FERREIRA e AQUILA, 2000). Os microorganismos também são afetados e apresentam sensibilidade à atividade de aleloquímicos de maneira semelhante, principalmente sendo sensíveis a alterações em diversas reações metabólicas, podendo estas respostas variar de acordo com o grupo de microorganismos exposto (SMITH e BANKS, 1986; CHENG et al., 2008).

Quanto aos possíveis mecanismos de ação exercidos pelos diferentes aleloquímicos, a atividade sequestradora de radicais livres tornou-se alvo de estudos, pois os mesmos estão demonstrando que a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenha um importante papel na interação entre as plantas e seus patógenos, mutualistas e concorrentes (APPEL, 1993). Outro fator é que as ERO não só têm sido implicadas na transdução de sinal e nos mecanismos de defesa das plantas, mas também na resposta de hipersensibilidade, pois as ROS se acumulam nas células de plantas, em resposta a infecções por patógenos danificando as células, e conduzindo frequentemente à morte celular (HUCKELHOVEN e KOGEL, 2003 e ALMEIDA et al, 2008). Outro aspecto importante é que a toxicidade de muitos fenóis pode ser atribuída à formação de radicais que doam elétrons para o oxigênio molecular, formando superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e este pode sofrer uma série de reações adicionais para se tornar um aleloquímico mais reativo (radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ) ou peroxila ( $ROO\cdot$ )).

Subsequentemente, estes radicais podem afetar a permeabilidade da membrana, causar danos ao DNA e proteínas (TESTA, 1995; HAMMONDKOSAK e JONES, 1996; e DARIER e TAMMAM, 2012). Além disso, estudos demonstram que alguns aleloquímicos rapidamente despolarizam a membrana celular, aumentando a permeabilidade da mesma, induzindo a peroxidação lipídica, e causando uma interrupção celular generalizada que leva à morte celular (DEVI, 1996; ZENG et al, 2001 e YU et al, 2003) e que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> além de estar diretamente relacionada com toxicidade para microorganismos, contribui também para o reforço estrutural da parede de célula, coordenam a ativação de genes de defesa e produção de fitoalexinas (BRADLEY et al, 1992; GRANT e LOAKE, 2000 e WEIR et al, 2004).

Estudos vêm demonstrando o interesse crescente na identificação e extração de compostos provenientes do metabolismo secundário com propriedades alelopáticas, proporcionando campo promissor para a descoberta de praguicidas naturais que agem diretamente sobre as ervas daninhas e não causam danos ao meio ambiente (Young e Bush de 2009).

## **1.2 - Alelopatia no Cerrado**

O Brasil possui uma megadiversidade, que está entre as mais ricas do mundo. Nesse contexto, o domínio Cerrado é considerado como um dos “hotspots” mundiais (MITTERMEIER et al. 2005), uma vez que possui um grande número de espécies e, dentre estas, cerca de 4.400 endêmicas (MYERS et al., 2000; SILVA et al., 2002; CARVALHO et al., 2008); ocupa 2 milhões de Km<sup>2</sup>, cerca de 23% do território brasileiro, estendendo-se da margem da floresta amazônica até os estados de São Paulo e Paraná, sendo ultrapassado em tamanho apenas pela floresta Amazônica em extensão territorial (RATTER et al., 1997).

Do ponto de vista fitofisionômico o Cerrado é considerado como sendo uma savana, apresentando complexas e diversificadas fisionomias determinadas pela geomorfologia, macroclima, fitofisionomia, solo, altitude, ação do fogo e disponibilidade de água, sendo estes alguns dos principais elementos que caracterizam os diversos ambientes continentais (COUTINHO, 1982), o cerrado *senso latu* é composto por três principais formações, a savânica, campestre e a florestal, sendo que a fisionomia savânica perfaz mais de 70% do Cerrado quando adicionado as áreas dos campos cerrados e dos campos sujos (COUTINHO, 2006).

Estudos vêm evidenciando que a produção de compostos bioativos é acrescida pelas plantas submetidas a stress biótico e/ou abiótico; diante disto e levando em consideração as condições edafoclimáticas, assim como as características nutricionais do solo e a intensa

competição existente no cerrado, hoje há reconhecimento deste como um ecossistema promissor na busca de compostos bioativos (CHAVES E ESCUDERO, 1999). Atualmente estudos estão explorando melhor as potencialidades das espécies do cerrado tais como as alelopáticas, fitoterápicas e fitotóxicas dentre outras, atuando ainda no isolamento e identificação destes compostos bioativos (YOUNG e BUSH de 2009; IMATOMI et al., 2013)

Imatomi et al. (2013) isolaram a avicularin e juglanin, dois flavonoides do extrato acetato de etila das folhas de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., sendo que a fração de onde eles foram isolados apresentou inibição dose dependente do desenvolvimento do coleóptilo de *Triticum aestivum* L. cv. Pizon. observaram ainda nos testes de germinação e comprimento das partes aéreas realizados com agrião, alface, tomate e cebola respostas espécies dependente, podendo assim influenciar a composição de espécies vegetais de ecossistemas naturais.

*Aristolochia esperanzae* O. Kuntze, espécie frequente nos cerrados do Estado de São Paulo, apresentou, para os diferentes extratos aquosos, atividade inibitória da germinação e do desenvolvimento de plântulas de alface e rabanete (GATTI et al., 2004). De maneira semelhante no estudo realizado por Gusman et al. (2008), os extratos aquosos de *Baccharis dracunculifolia* D. C. evidenciaram potencialidades alelopáticas sobre a germinação das sementes e no crescimento da parte aérea e do sistema radicular de *Brassica campestris* L., *B. oleracea* L. cv. Capitata, *Citrullus lanatus* Thunb., *Eruca sativa* L., *Lactuca sativa* L. cv. Branca Boston, Grand Rapids e Simpson, *Lycopersicum esculentum* Mill., *Raphanus sativus* L. e *Zea mays* L.

Wandscheer e Pastorini (2008) evidenciaram potencial alelopático em seu estudo com *Raphanus raphanistrum* L. onde extratos aquosos de diferentes partes vegetais induziram redução tanto da germinação quanto do comprimento radicular de alface e tomate. Assim como Povh et al. (2007) observaram em seu trabalho realizado com extrato aquoso de *Machaerium acutifolium* Vog., onde a germinação e seus índices apresentaram alterações significativas com o aumento da concentração do extrato.

Demonstrado o potencial das espécies pertencentes a esse ecossistema para a prospecção e descoberta de novas biomoléculas com potencial utilização farmacológica, agrônômica e em outras áreas, colaborando também para o entendimento das relações ecofisiológicas mediadas por aleloquímicos (MACÍAS et al., 2008).

### **1.3-Espécies exótica invasoras e alelopatia**

Espécies que ocorrem em uma área fora de seu limite natural historicamente conhecido, como resultado de dispersão acidental ou intencional através de atividades humanas, são tratadas como exóticas, sendo geralmente aceitas como tais as espécies de outros países e/ou continentes. No entanto, atualmente, espécies registradas fora de sua área de distribuição natural dentro do mesmo país são reconhecidas como espécies exóticas, e este evento pode ser denominado ainda de contaminação biológica (SIMBERLOFF, 2003; PIMENTEL et al., 2005).

As primeiras transferências de espécies vegetais de uma região do planeta para outra tiveram a finalidade de suprir necessidades agrícolas, florestais e outras de uso direto, sendo que relatos indicam que um dos primeiros registros apontando para o problema das invasões por plantas foi feito pelo naturalista Charles Darwin, que registrou a ocupação dos pampas na Argentina e no Chile por *Cynara cardunculus* L., um arbusto espinhento (ZILLER, 2001). Plantas exóticas invasoras são uma das grandes responsáveis pela quebra do equilíbrio em uma comunidade, e um fato importante é que elas, ao contrário de outros problemas ambientais, com o passar do tempo, tendem a expandir sobre os ambientes naturais, gerando grandes preocupações (ZILLER, 2000; PERRINGS et al., 2005).

Nesse sentido, a invasão biológica é o resultado do processo de introdução e adaptação de espécies que não fazem parte, naturalmente, de um dado ecossistema, mas que se naturalizam e passam a provocar mudanças em seu funcionamento, entrando em competição com as nativas, apresentando possivelmente interações alelopáticas que podem ser essenciais para o sucesso da invasão, causando alterações nos processos ecológicos naturais e podendo exercer um estado de dominância nesse ambiente. (INSTITUTO DE RECURSOS MUNDIAIS; UNIÃO MUNDIAL PARA A NATUREZA; PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE, 1992; ZILLER, 2000; LI e XIE, 2002).

Entre alguns atributos das espécies exóticas invasoras que podem favorecer o processo de invasão, estão as características de reprodução, tais como grandes produções de sementes, alta porcentagem de germinação, as de propagação (como dispersão anemocórica por longas distâncias), assim como outras adaptações de meios de transporte, e a adaptabilidade ambiental, como plasticidade fenotípica, alterações comportamentais e de características genéticas, apresentando ainda síntese e liberação de biomoléculas (aleloquímicos) que exercem interferência sobre outros vegetais e/ou microorganismos (REJMANEK e RICHARDSON, 1996; SMITH e WAITERS, 1999; SAGE, 2004).

O potencial alelopático de espécies exóticas invasoras está no foco de pesquisadores, tanto para o uso no desenvolvimento de praguicidas naturais, como também para tentar entender melhor os mecanismos que favorecem a invasão e estabilização das mesmas no ambiente (SCHERER et al., 2005)

Entre as espécies exóticas invasoras em nosso país algumas já apresentam estudos que buscam analisar seu potencial alelopático, como o estudo realizado por Pereira et al. (2009) com *Eucalyptus citriodora* H. e *Pinus elliottii* E. que utilizou extrato aquoso da casca e das folhas de eucalipto e de acículas de Pinos para observar possíveis alterações na taxa de germinação e no crescimento da plântula de alface e amarelinho (*Tecoma stans* L.); verificaram que o extrato de acículas de Pinus não inibe expressivamente a germinação de alface e do amarelinho; o extrato de folhas de eucalipto apresentou alta taxa de inibição da germinação e do desenvolvimento da plântula de alface, não sendo o mesmo observado com extrato da casca e nos testes com a semente do amarelinho. Wandscheer et al. (2011) utilizaram extrato aquoso de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. verificando significativa redução da porcentagem de germinação e da velocidade de germinação, confirmando seu potencial alelopático.

Grassi et al. (2005) realizaram estudos com *Memora peregrina*, “ciganinha”, e observaram redução de 30% do peso larval de *Anagasta kuehniella* em testes realizados com um iridoide isolado desta planta; já os testes de germinação e desenvolvimento de plântulas com alantoina isolada, apresentou indução da germinação e promoção do crescimento das plântulas.

Ibarra (2009) realizou a caracterização fitoquímica de extratos das folhas de *Tecoma stans* uma espécie exótica e invasora onde foi encontrada a presença de alcaloides, cumarinas, flavonóides, sesquiterpeno lactona, esteróis, saponinas, e açúcares, sendo que o extrato etanólico apresentou maior número de famílias de metabólitos secundários. Salvadó et al. (2002) já haviam realizado testes de extratos de folhas frescas e secas apresentando resultados similares aos referidos anteriormente, sem encontrar diferenças evidentes entre os extrato de folhas frescas e secas, evidenciando uma possível relação do potencial invasor desta espécie com sua capacidade de produção e liberação para o meio ambiente de aleloquímicos.

Kim e Lee (2011) consideram que a interferência alelopática pode ser um mecanismo fundamental no processo de invasão por plantas, evidenciando cada vez mais a capacidade destas em produzir e liberar para o meio ambiente aleloquímicos, capazes de interferir na estabilização e desenvolvimento das espécies adjacentes, demonstrando a importância destas espécies para as pesquisas que buscam novos compostos químicos de interesse.

## 1.4. Espécies Estudadas

### 1.4.1 - *Tridax procumbens* L.

*Tridax procumbens* L., pertence à Asteraceae e é vulgarmente conhecida por erva-de-touro, destaca-se por ser uma planta amplamente invasora e por sua capacidade em eliminar as espécies adjacentes, sobressaindo em seu habitat. Essa espécie é originária da América Central, tendo se expandido para América do Sul. No Brasil, tem ocorrência muito intensa especialmente na região Centro-Oeste e Sudeste, continuando a avançar para outras regiões. O fato de florescer e frutificar durante quase todo o ano torna essa planta altamente agressiva como infestante. Assim, sua importância tem crescido rapidamente, sendo uma das invasoras mais comuns nas áreas onde ocorre (KISSMANN e GROTH, 1999).

*Tridax procumbens*, é caracterizada por flores do raio creme a amarelo pálido e folhas simples e opostas, (TELES e BAUTISTA, 2006, HATTORI e NAKAJIMA, 2008). Na medicina tradicional é utilizada como anticoagulante, antifúngica, repelente de insetos, expectorante, antidiarréica e antidesentérica. Além disso, possui atividade de cicatrização e promove o crescimento do cabelo (RAVIKUMAR et al., 2005). Encontram-se também relatos da utilização do infuso da folha para tratamento da hipertensão arterial (SALAHDEEN et al., 2004).

Estudos científicos têm demonstrado que o extrato de *T. procumbens* possui componentes que apresentam efeitos hipotensores (SALAHDEEN et al., 2004), ação hepatoprotetora (RAVIKUMAR et al., 2005), atividade imunomoduladora, antibiótica, antioxidante, antiinflamatória e antitumoral, (TIWARI et al., 2004; SHARMA e KUMAR, 2009; AGRAWAL et al., 2009; JACHAK et al., 2011; VISHNU et al., 2011). Quanto à caracterização fitoquímica dessa espécie, foi demonstrada a presença de alcaloides, carotenoides, flavonoides (catequinas e flavonas), saponinas e taninos (JUDE et al., 2009; AGRAWAL e TALELE, 2011).

Asteraceae possui características variadas, apresentando plantas com hábitos herbáceo, arbustivo, e arbóreo, apresenta distribuição cosmopolita, com aproximadamente 1.535 gêneros e ao menos 22.000 espécies, sendo assim a segunda maior família de plantas floríferas; no Brasil, a família está representada por aproximadamente 300 gêneros e cerca de 2000 espécies (PRUSKI e SANCHO, 2004; SOUZA e LORENZI, 2008).



#### 1.4.2 - *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl.

*Ouratea spectabilis* pertencente à família Ochnaceae, é uma planta decídua, heliófita, indiferente quanto às condições de solo, secundária, característica dos biomas cerrado e campos cerrados, podendo ser encontrada nos seguintes estados: Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Apresenta de 4-5 metros de altura, copa globosa ou irregular e rala, tronco tortuoso, casca suberosa e descamante, folhas simples, alternas, com 8-13cm de comprimento e 4-7 de largura, inflorescência em panículas terminais com floração de agosto a setembro, frutos do tipo drupa ovóide frutificando de outubro a novembro (LORENZI, 1998). Relatos populares indicam utilização de *Ouratea spectabilis* para tratar distúrbios gástricos e reumáticos. Estudo fitoquímico de extrato preparado desta espécie revelou a presença de bigenkanina e metoxiflavona, dois biflavonoides demonstrando capacidade para a produção de metabolitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética e agrícola (FELÍCIO et al., 1995).

A família Ochnaceae possui interesse econômico restrito a poucas espécies ornamentais, sendo compostas por arbustos, árvores ou raramente ervas, apresenta distribuição pantropical, incluindo aproximadamente 30 gêneros e 400 espécies sendo que no Brasil são encontrados 13 gêneros e cerca de 120 espécies (SOUZA e LORENZE, 2008).

## 2. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S.S.; TALELE, G.S. Bioactivity guided isolation and characterization of the phytoconstituents from the *Tridax procumbens*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.58-62, Jan./Feb, 2011.

AGRAWAL, S.S.; TALELE, G.S.; SURANA, S.J. Antioxidant Activity of Fractions from *Tridax procumbens*. **Journal of Pharmacy Research**, v.2, p.71-73, 2009.

ALMEIDA, F. S. A. **Alelopatia em plantas**. Londrina, PR, IAPAR, Circular, v. 53, 60p., 1988.

ALMEIDA, G.D., ZUCOLOTO, M., ZETUN, M.C., COELHO, I., SOBREIR, F.M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos, **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v.61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.

ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Revista Floresta**, v.10, n.1, p.93-97, jan./jul, 2003. and native species in East Asia: support for the novel weapons hypothesis. **Ecol. Res.** 26, 87-94.

APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions — the importance of oxidation. **Journal Chemical Ecology**, v. 19, p. 1521-1552, 1993.

BRADLEY, D.J., KJELLBOM, P. AND LAMB, C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response. **Cell**. v. 70, p. 21-30, 1992.

CARVALHO, F.A.; RODRIGUES, V.H.P.; KILCA, R.V.; SIQUEIRA, A.S.; ARAÚJO, G.M.; SCHIAVINI, I. Floristic composition, richness and diversity of a cerrado sensu stricto in southeastern goiás state, brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 64-72, 2008.

CHENG, W.; XUEXIU, C.; HONGJUAN, D.; DIFU, L.; JUNYAN, L. Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism. **Acta Ecologica Sinica**, v.28, n.6, p.2595-2603, 2008.

CHAVES, N., ESCUDERO, C., 1999. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M., Foy, C.L. (Eds.), Principles and Practices in Plant Ecology – Allelochemical Interactions. CRC Press, pp. 267–285.

CHOU, C.H.; KUO Y.L. Allelopathic research of subtropical vegetation in taiwan. III. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Journal of Chemical Ecology**, v.12, p.1431-1448, 1986.

COUTINHO, L.M. Ecological effects of fire in Brazilian Cerrado. In: B. J. Huntley & B.H. Walker (Eds.). **Ecology of Tropical Savannas**. Berlin: Springer-Verlag. 1982. p. 273-291.

COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, p. 1-11, 2006.

DARIER, S.M., TAMMAM, A.A. Potentially phytotoxic effect of aqueous extract of *Achillea santolina* induced oxidative stress on *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*, **Romanian Journal of Biology Plant Biology**, v. 57, n 1, p. 08-25, 2012.

DEVI, S.R. AND PRASAD, M.N.V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. **Biologia Plantarum**. v. 38, p. 387-395, 1996.

EINHELLIG, F.A., 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderjit., Dakshini, K.M.M., Foy, C.L. (eds.), Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 479-494.

FELÍCIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A.P. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. **Planta Medica**, v.61, p.217-220, 1995.

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

GATTI, A.B., PEREZ, S.C.J.G.A., LIMA, M.I.S. Atividade alelopática dos extratos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, p. 459-472, 2004.

GNAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, n.3, p.395-407, 2005.

GRANT, J.J. AND LOAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**. v. **124**, p. 21-30, 2000.

GRASSI, R.F.; RESENDE, U.M.; SILVA, W.; MACEDO, M.L.R.; BUTERA, A.P.; TULLI, E.O.; SAFFRAN, F.P.; SIQUEIRA, J.M. Estudo fitoquímico e avaliação alelopática de *memora peregrina* – “ciganinha” –bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em mato grosso do sul. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2005.

GUSMAN, G.S.; BITTENCOURT, A.H.C.; VESTENA, S. Allelopathy of *Baccharis dracunculifolia* DC. on the germination and development of cultivated species. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 30, n. 2, p. 119-125, 2008.

HAMMONDKOSAK, K.E. AND JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell** v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A Família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.59, n.4, p.687-749, Março./ Junho. 2008.

HUCKELHOVEN, R. AND KOGEL, K.H. Reactive oxygen intermediates in plant–microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? **Planta**, v. 216, p. 891-902, 2003.

IBARRA, M. J et al. Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa. **Información Tecnológica**, Nuevo León, México, v.20, n.5, p. 55-65, 2009.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A.P.; GUALTIERI, S.C.J.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v 46, p. 29–35, 2013.

INDERJIT. Plant Phenolics in Allelopathy. **The Botanical Review**, v.62, n.2, p.186-197, 1996.

INDERJIT.; DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, p. 28–44, 1995.

INDERJIT; CALLAWAY R.M. Experimental designs for the study of allelopathy. **Plant Soil**, v.256, p.1-11, 2003.

INSTITUTO DE RECURSOS MUNDIAIS; UNIÃO MUNDIAL PARA A NATUREZA; PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE. **A estratégia global da biodiversidade** – diretrizes de ação para estudar, salvar e usar de maneira sustentável e Rev. SBAU, Piracicaba, v.3, n.2, jun. 2008, p.78-97 9696 justa a riqueza biótica da Terra. Curitiba: World Resources Institute / Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 1992. 232 p.

JACHAK, S.M.; GAUTAM, R.; SELVAM, C.; MADHAN, H.; SRIVASTAVA, A.; KHAN, T. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. **Fitoterapia**, v.82, p.173–177, 2011.

JUDE, C.I.; CATHERINE, C.I.; NGOZI, M.I. Chemical Profile of *Tridax procumbens* Linn. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 548-550, 2009.

KIM, Y.O.; LEE, E.J. Comparison of phenolic compounds and the effects of invasive and native species in East Asia: support for the novel weapons hypothesis. **Ecological Research**, v. 26, p. 87-94, 2011.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 1999. Tomo III. 978 p.

LI, Z.Y.; XIE, Y. (eds). *Zhongguo Wailai Ruqin Zhong* (Invasive alien species in China). *Zhongguo Linye Chubanshe* (**China Forestry Publishing House**), Beijing, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 2, 2ª ed., Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 1998.

MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G.; HELIKAURANOSIDE A. A New Bioactive Diterpene. **Journal Chemical Ecology**, v.34, p.65-69, 2008.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; GALINDO, J.C.G. Allelopathy - A natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v.63, p.327-348, 2007.

MAIRESSE, L.A.S. et al. Bioatividade de Extratos Vegetais Sobre Alface (*Lactuca sativa* L.1). **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.2, p. 1-12. 2007.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n. 3, p. 601-611, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-861, 2000.

PEREIRA, G.H.A.; OLIVEIRA, V. E.; SILVA, C. O.; GOI, S. R. Efeito Alelopático de *Eucalyptus Citriodora* H. e *Pinus Elliottii* E. sobre a Germinação e o Crescimento de *Lactuca Sativa* L. (Alface) e *Tecoma Stans* (L.) Juss. Ex Kunth (Ipê - de - Jardim). **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço - MG

PERRINGS C.; DEHNEN-SCHMUTZ K.; TOUZA J.; Williamson M. How to manage biological invasions under globalization. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 5, p. 212-215, 2005.

PIMENTEL, D.; LACH, L.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, p. 273-288, 2005.

POVH, J.A.; PINTO, D.D.; CORRÊA1, M.O.G.; ONO, E.O. Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 447-449, jul. 2007.

PRUSKI, J.F.; SANCHO, G. 2004. Asteraceae or Compositae (*Aster* or Sunflower family). In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. (Ed.). **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton, Princeton University Press, pp. 33-39.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAVIKUMAR, V.; SHIVASHANGARI, K.S.; DEVAKI, T. Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens* against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p.55-60, março. 2005.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. e GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, n.5, p.577-608, 1999.

REJMANEK, M.; RICHARDSON, D.M. What attributes make some plant species more invasive? **Ecology**, v. 77, n. 6, p. 1655-1661, 1996.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, p.422, 1984.

RIZVI, S.G.H.; RIZVI, V. (Eds.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman and Hall, p.480, 1992.

SAGE, R.F. The evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist**, v. 161, p. 341-370, 2004.

SALAHDEEN H. M.; YEMITAN O. K.; ALADA A. R. A. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Tridax Procumbens* On Blood Pressure And Heart Rate In Rats. **African Journal of Biomedical Research**, v.7, p.27-29, 2004.

SALVADÓ, A. C.; RIVERO, G. J.; NARANJO, J. P. Droga cruda y extracto fluido de *Tecoma stans* L. **Revista Cubana de plantas medicinales**, Habana, v.7 n.3, p.138-41, junio. 2002.

SCHERER, L. M. et al. Efeito alelopático do extrato aquoso de folha e de fruto de leucena (*Leucaena leucocephala* Wit) sobre a germinação e crescimento de raiz da canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 161-166, abr./jun. 2005.

SHARMA B., KUMAR P. Extraction and Pharmacological Evaluation of Some Extracts of *Tridax procumbens* and *Capparis decidua*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.1, n.4, p.5-12, Jan. 2009.

SILVA, F.M.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas, **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.4, p.547-555, jan. / mar., 2006.

SILVA, F.M.; AQUILA, M.E.A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.20, n.1, p.61-69, jan. / mar. 2006.

SILVA, L.O.; Costa, D.A.; Filho, K.E.S.; Ferreira, H.D.; Brandão, D. Levantamento florístico e fitossociológico em duas áreas de cerrado *sensu stricto* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. **Acta Botânica Brasílica, São Paulo**, v. 16, n. 1, 2002.

SIMBERLOFF, D. Confronting introduced species: a form of xenophobia? **Biological Invasions**, v. 5, p. 179-192 2003.

SMITH, C.M.; Waiters, L.J. Fragmentation as a strate for *Caulerpa* species: fates of fragments and implications for management of an invasive weed. **Marine Ecology**. v. 20, n. 33, p. 307-319, 1999.

SMITH, D. A.; BANKS, S. W. Biosynthesis, Elicitation and Biological Isoflavonoid Phytoalexins. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p 972-995, 1986.

SOUZA V.C. e LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG 2ª ed., Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 2008.

TELES, A. M.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae no Parque Metropolitano de Pituvaçu, Salvador, Bahia, Brasil. **Lundiana**, v.7, n.2, p.87-96, abr./dez. 2006.

TESIO, F.; VIDOTTO, F.; FERRERO, A. Allelopathic persistence of *Helianthus tuberosus* L. residues in the soil. **Scientia Horticulturae**, v.135, p.98–105, 2012.

TESTA, B. The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. **Academic Press**, v. 475, p. 26, 1995.

TIWARI, U.; RASTOGI, B.; SINGH, P.; SARAF, D.K.; VYAS, S.P. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.13-119, 2004.

VISHNU, P.P.; RADHIKA, K.; SIVA, K.R.; RAMCHANDRA, S.M.; PRAMEELA, D.Y.; SRINIVAS, R.A. Evaluation of anti-cancer activity of *Tridax procumbens* flower extracts on PC 3 cell lines. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 2: p. 26-30. 2011.

VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v.58, p.1631-1646, 2002.

WANDSCHEER, A.C.D.; PASTORINI, L.H. Allelopathic interference of *Raphanus raphanistrum* L. on the germination of *Lactuca sativa* L. and *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p. 949-953, jul, 2008.

WANDSCHEER, A.C.D.; BORELLA, J.; BONATTI, L.C.; PASTORINI, L.H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasílica** 25(1): 25-30. 2011.

WEIR, T.L., PARK, S.W. AND VIVANCO, J.V. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 7, p. 472–479, 2004.

YOUNG, G. P.; BUSH, J. K. Assessment of the allelopathic potential of *Juniperus ashei* on germination and growth of *Bouteloua curtipendula*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 1, p. 74-80, 2009.

YU, J.Q., YE, S.F., ZHANG, M.F. AND HU, W.H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 129-139, 2003.

ZENG, R.S., LUO, S.M., SHI, Y.H., SHI, M.B. AND TU, C.Y. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 72-79. 2001.

ZILLER, S.R. 2000. A Estepe Gramíneo-Lenhosa no Segundo Planalto do Paraná: Diagnóstico Ambiental com Ênfase à Contaminação Biológica. Tese de Doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. 268 p.

ZILLER, S.R. *Plantas exóticas invasoras: A Ameaça da Contaminação biológica*. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, n.178. p.77-79, 2001.

## Capítulo 1

### Fitotoxicidade de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae) sobre a germinação e o desenvolvimento vegetal

Gustavo F. Mecina<sup>(1)</sup>, Valter H. M. dos Santos<sup>(2)</sup>, Aníbal R. de Andrade <sup>(1)</sup>, Anne L. D. Bosqueiro<sup>(3)</sup>, Luiz L. Saldanha<sup>(3)</sup>, Luciana P. Silva<sup>(1)</sup>, Regildo M. G. Silva<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

<sup>(2)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, Fisiologia Vegetal, Distrito de Rubião Jr., s/nº, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>(3)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Ciência Biológica, CEP 17033-360, Bauru, São Paulo, Brazil.

\*Autor para correspondência. Tel.: +5518; fax: +5518  
e-mail: regildo@assis.unesp.br



**Resumo:** Os efeitos tóxicos de compostos químicos no crescimento e no desenvolvimento das plantas são denominados fitotoxicidade. Estes podem ocorrer em ambientes naturais principalmente por meio da liberação de biomoléculas (aleloquímicos), que podem variar em sua constituição e classe química dependendo da espécie produtora. Estes compostos apresentam potencial para serem utilizados como herbicidas naturais atuando no controle de pragas no manejo agrícola. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico dos diferentes extratos e frações de *Tridax procumbens*, por meio de bioensaios de pré e pós-emergência em sementes de *Lactuca sativa* L. e índice mitótico em células de raízes *Allium cepa* L. Visou também caracterizar fitoquimicamente os compostos químicos presentes no extrato e fração mais bioativos. Foi observado que a germinabilidade e o desenvolvimento das plântulas testadas foram reduzidos pelos diferentes extratos e fração acetato de etila do extrato etanólico, verificando ainda alterações no índice mitótico quando o mesmo foi comparado com o controle negativo. A identificação fitoquímica realizada por meio de HPLC-PAD mostrou uma quantidade considerável de compostos flavonoídicos no extrato etanólico e sua fração acetato de etila. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a espécie *T.procumbens* possui compostos fitotóxicos, possivelmente de origem flavonoídica, que estão correlacionadas com sua capacidade invasora e daninha.

Palavras chave: Germinação; Fitotóxico; Fitoquímica; Índice Mitótico.

## 1. Introdução

Fitotoxicidade é um termo utilizado para descrever os efeitos tóxicos de algumas classes de compostos no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais (Inderjit et al., 1999), sendo que estes podem ser resultados de alterações moleculares e/ou celulares, assim como modificações na transcrição gênica e/ou na duplicação da molécula de DNA, o que pode causar mutações e aberrações cromossômicas, resultando em danos em processos vitais da planta alvo (Gniazdowska e Bogatek, 2005). O efeito fitotóxico pode ser causado por uma grande variedade de compostos, incluindo metais pesados, pesticidas e substâncias aleloquímicas (Martins et al., 2007; Guimaraes et al., 2007; Carvalho et al., 2009). Uma planta produtora de compostos alelopáticos (aleloquímicos) pode ser considerada fitotóxica quando esta produz uma grande variedade de substâncias químicas que, se liberadas no ambiente, têm a capacidade de interferir de modo direto ou indireto no crescimento e desenvolvimento das espécies vizinhas (Chou e Kuo, 1986; Costa e Menk, 2000; Souza Filho e Alves, 2002).

Pesquisas realizadas com o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas, têm sido frequentemente utilizadas para a identificação de substâncias potencialmente tóxicas, especialmente as que apresentam características alelopáticas (Inderjit e Callaway, 2003; Noldin et al., 2003). Sendo assim, a atividade alelopática de extratos pode ser avaliada por meio de seu efeito sobre a germinação de algumas espécies sensíveis pré-selecionadas e também por meio de outros testes como o índice mitótico e aberrações cromossômicas (Morel e Guillemain, 2004). Espécies como alface, tomate, cebola, rabanete e pepino são frequentemente utilizadas como bioindicadores de efeitos fitotóxicos (Mazzafera, 2003; Morel e Guillemain, 2004).

Diante do exposto, estudos recentes têm demonstrado que as aplicabilidades dos aleloquímicos são importantes recursos para o controle de plantas daninhas, insetos, algas e microorganismos que prejudicam de forma direta e/ou indireta a produção agrícola bem como a saúde humana (Leflaive e Ten-Hage, 2007; Hajimahmoodi et al., 2010; Bártová et al., 2011; Zak et al., 2011; El Marsni et al., 2011; Kato-Noguchi et al., 2012).

O Brasil encontra-se como o quinto maior consumidor do mundo de agrotóxicos utilizando mais de 150 mil toneladas, sendo que destes, 33% são herbicidas (IBGE, 2009). Nas diferentes áreas agrícolas produtivas do Brasil e em suas diferentes culturas, o manejo de plantas invasoras e pragas agrícolas vem sendo baseado principalmente no controle químico, sendo sua utilização frequentemente inadequada, podendo causar diversos danos, como o desequilíbrio de ecossistemas, alteração das propriedades físicas e químicas da água e do solo,

o que representa um desafio para o manejo agroecológico atual (Mascarenhas, 1999; Lorenzi, 2000; Modesto Júnior, 2001; Macías et al., 2007).

Dentro deste contexto, *Tridax procumbens* L. (Asteraceae), conhecida popularmente por erva-de-touro, destaca-se por ser uma planta invasora, ocorrendo principalmente em ambientes de clima tropical e subtropical, ocupando pastagens, prados, áreas de cultivo, acostamento de rodovias e áreas degradadas. Tornou-se uma infestante altamente hostil, por tratar-se de uma espécie que floresce e frutifica quase o ano inteiro (Kissmann e Groth, 1999). É conhecida por apresentar atividades terapêuticas, como efeitos hipotensores (Salahdeen et al., 2004), atividade imunomoduladora, antibiótica, antioxidante, antiinflamatória e antitumoral, (Tiwari et al., 2004; Sharma e Kumar, 2009; Agrawal et al., 2009; Jachak et al., 2011). Estudos fitoquímicos realizados demonstraram a presença de alcaloides, carotenoides, flavonoides (catequinas e flavonas), saponinas e taninos nesta espécie. (Jude et al., 2009; Agrawal e Talele, 2011).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico dos diferentes extratos e frações de *T. procumbens*, por meio de bioensaios de pré e pós-emergência em sementes de *Lactuca sativa* L. e índice mitótico em células de raízes *Allium cepa* L. Visou também elucidar fitoquimicamente os compostos químicos presentes no extrato e fração mais bioativos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal e preparação dos extratos**

As partes aéreas (ramos, folhas e flores) de *Tridax procumbens* foram coletadas de espécimes presentes na Universidade Estadual Paulista – Assis – SP (22°39'42''S e 50°24'44''W, Altitude: 546m). O voucher da espécie está depositada na coleção científica do laboratório de Sistemática Vegetal, FCL, UNESP – Assis (HASSI) subnúmero 113. Para preparação dos extratos, as partes vegetais foram lavadas, secas em estufa (40°C) e pulverizadas. O extrato aquoso foi obtido por agitação mecânica, em água destilada (proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas a 24°C). Logo após foi filtrado a vácuo, congelado e liofilizado (modelo: L101, Líotop, Brasil) para obtenção do extrato seco. O extrato hidroetanólico foi obtido por agitação mecânica em uma solução de etanol: água (70:30) na proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas, o processo foi repetido por 3 vezes com mesmo material vegetal. Logo após, o extrato obtido foi filtrado e levado ao evaporador rotativo (modelo: MA120, Marconi, Brasil) a 60°C para retirada do etanol e posteriormente congelado e liofilizado para obtenção do extrato seco. O mesmo foi feito para o extrato etanólico, onde

somente foi substituindo a solução etanol:água (70:30) por etanol absoluto (IMPEX, Brazil), sendo que o extrato seco foi obtido após concentração em evaporador rotativo seguido de câmara de dessecação a temperatura ambiente.

## **2.2 Bioensaio de Alelopatia para Pré-emergência**

O bioensaio de pré-emergência foi realizado com sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids (Alface) por meio do controle da germinação das sementes desta planta em placa de *Petri* (60 mm × 15 mm) e papel de germinação, com umidade relativa, temperatura e luminosidade controladas artificialmente em estufas de Germinação tipo BOD (Biological Oxygen Demand) (model: 411/FPD, Nova Ética, Brazil). Para tanto foi montado um experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde placas de *Petri* foram separadas em grupos experimentais e controle, contendo 50 sementes de alface em cada placa, com seis repetições para cada grupo experimental, tratados com os diferentes extratos *T. procumbens* (nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL), e um grupo controle negativo (água). Como critério para avaliação da germinação foi utilizado a protrusão e a curvatura geotrópica da radícula, conforme indicado por Labouriau (1983). As sementes que apresentaram falsa germinação por embebição não foram contabilizadas nos resultados. O monitoramento da germinação das espécies foi feito a cada 06 horas, durante 48 horas.

Para os resultados obtidos nos ensaios, diferentes índices foram calculados: porcentagem média de germinação ( $[\sum ni/A] \cdot 100$ ), tempo médio de germinação ( $T_m = [\sum ni \cdot t_i] / \sum ni$ ) e velocidade média de germinação ( $V_m = 1/T_m$ ) sendo  $n_i$  = Número de sementes germinadas em cada instante “ $t_i$ ”;  $A$  = Número total de sementes colocados para germinar; e  $t_i$  = Tempo entre o início do experimento e a hora  $i$ -th da observação (Santana e Ranal, 2004, Pereira et al., 2009).

## **2.3 Bioensaio de Alelopatia para Pós-emergência**

O bioensaio foi realizado conforme método proposta por Soares (2000) e Alves et al. (2004) e adaptado às nossas condições laboratoriais. As sementes de alface foram previamente germinadas em placas de *Petri*, forradas com papel de germinação umedecido com água destilada. Depois de 24hs em condições de estufa BOD, as plântulas que apresentaram em média 2mm de comprimento foram utilizadas no bioensaio, que foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com placas de *Petri* contendo como substrato papel de germinação, umedecidos com 1mL da solução dos diferentes extratos de *T.*

*procumbens*. Estas foram separadas em grupos experimentais e controle, contendo 25 plântulas em cada placa, com quatro repetições para cada tratamento e para o controle (água).

O seguimento evolutivo dos tratamentos foi realizado pela observação e medição das radículas e hipocótilo das plântulas, por meio de um paquímetro digital (model: IP65, DIGIMESS®, Brazil), a cada 24 horas até completar 48 horas de exposição (MIRÓ et al., 1998; PROCOPIO et al., 2005).

#### **2.4 Tratamento estatístico para os testes de pré e pós-emergência**

Para o tratamento estatístico dos testes de pré e pós-emergência foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade (Levene). Os dados transformados não apresentaram normalidade e suas variâncias não foram homogêneas, assim os resultados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e Dunn ( $\alpha=0,05$ ) com auxílio do software BioEstat 5.3, de acordo com o proposto por Santana e Ranal, (2004).

#### **2.5 Fracionamento do extrato**

O extrato bruto etanólico das partes vegetais de *Tridax procumbens* foi submetido ao fracionamento, pois apresentou a maior atividade alelopática nos ensaios de pré e pós-emergência. Para tanto uma coluna cromatográfica foi montada com cerca de 75% de sílica Gel 60 (Sigma-Aldrich®, USA) e 25% de Sílica Gel 60 incorporada com 2,0g de extrato. A sequência de solventes para a eluição foi: n-Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, Acetato de Etila:Metanol (70:30), Acetato de Etila: Metanol (50:50), Acetato de Etila: Metanol (30:70) e Metanol. As mudanças de solventes foram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência de separação. As frações filtradas foram concentradas no evaporador rotativo a  $40\pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram submetidas ao bioensaio tanto para pré como pós-emergência.

#### **2.6 Determinação do potencial osmótico, pH e condutividade elétrica.**

A determinação do potencial osmótico foi realizada de acordo com técnica descrita por Villela et al. (1991). O tratamento foi avaliado por soluções osmóticas obtidas com o uso de Polietileno glicol 6000 (PEG 6000). Os valores dos potenciais osmóticos obtidos nas soluções de PEG6000 foram comparados com os valores encontrados nos extratos de *T. procumbens*.

O pH dos diferentes extratos de *T. procumbens* foi determinado utilizando um pHmetro (Tecnopon® modelo MPA210). De modo semelhante, a condutividade elétrica foi

medida com um medidor de condutividade (Medidor de Condutividade Instrutherm®, modelo CD860).

## **2.7 Índice mitótico em células de raiz de *Allium cepa***

Sementes de *Allium cepa* (cebola) foram previamente germinadas em placas de *Petri*, quando as raízes das plântulas atingiram 1cm de comprimento foram expostas aos extratos nas concentrações que apresentaram maior atividade nos experimentos de pré e pós-emergência, por um período de 48 horas, após este período foram recolocadas em placa de *Petri* contendo água destilada até atingirem 5cm médio de comprimento (período de recuperação). Todo o experimento foi realizado em condições de estufas de germinação tipo BOD. As raízes foram fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto e ácido acético glacial, 3:1). Para montagem e análise das raízes, as mesmas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C, durante 8 minutos, e posteriormente foram coradas em Reativo de Schiff por 2 horas ao abrigo da luz. As raízes foram colocadas sobre lâminas e adicionado uma gota de Carmin acético 2% e cobertas por lamínulas. Foram esmagadas e fixadas. As análises foram realizadas em microscópio óptico (100x). Foram observadas 5000 células/ tratamento. Os efeitos fitotóxicos dos extratos foram determinados pela análise do índice mitótico ( $n^{\circ}$  total de células em divisão/ $n^{\circ}$  total de células analisadas x 100).

Para a análise estatística do ensaio de *A. cepa* os resultados foram submetidos aos testes não paramétricos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (nível de significância da análise de 5% e 1%) de acordo com Leme e Marin-Morales (2009).

## **2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089S Plus (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 200 - 900 nm, modelo MD-2015 Plus (Jasco®), injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®) com *loop* de 50 mL e forno de coluna modelo CO-2060 Plus. O software Jasco *ChromPass* (Versão 1.8.1.6) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados cromatográficos. Foi utilizado coluna de fase reversa imobilizada com octadecilsilano, modelo Luna C<sub>18</sub> (2) 100A (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d., com partículas com tamanho médio de 5 µm com coluna de guarda (Phenomenex®) de 4 x 3 mm i.d.. Uma alíquota de 10 mg do extrato etanólico e da fração acetato de etila foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila (ACN) 100% e filtrada em filtro de seringa com poro de 0,45 µm. As amostras foram monitoradas por detector PDA na faixa de 200-600 nm. O

cromatograma foi obtido em 334 nm. Fase móvel: Acetonitrílica + 0,1% Ác. Fórmico (A) e Água + 0,1 % de Ác. Fórmico. Gradiente: 10-35% de A em B em 60 min.

### 3. Resultados

#### 3.1 Ensaio de pré e pós-emergência com os extratos de *T. procumbens*.

Os resultados do ensaio de pré-emergência das sementes expostas às diferentes concentrações do extrato aquoso estão apresentado na Tabela 1. As sementes tratadas com a concentração de 5mg/mL não apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle, porém diferiram quando comparadas com os tratamentos 10 e 20mg/mL que apresentaram redução de 16,0% e 89,0% na germinação, respectivamente. Sendo que estas diferiram entre si e com o controle água (99,33% de germinação). Quanto ao tempo médio de germinação, as diferentes concentrações não diferiram estatisticamente entre si, mas foram diferentes significativamente do controle água. Para a velocidade média de germinação o tratamento de 5mg/mL foi significativamente diferente em relação ao controle água e aos tratamentos de 10 e 20mg/mL, sendo que estes não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes quando comparados com o controle água.

Para o extrato hidroetanólico foi verificada uma redução da taxa germinação para as diferentes concentrações avaliadas (5mg/mL=7,67%, 10mg/mL=60,67% e 20mg/mL=99,00%), sendo estas diferentes estatisticamente entre si e em comparação ao grupo controle (99,0%). Em relação ao tempo médio de germinação, as três concentrações, quando comparadas, apresentaram - se estatisticamente diferentes entre si e do grupo controle. Para a velocidade média de germinação o grupo tratado com a concentração de 20mg/mL diferiu significativamente dos grupos tratados com as concentrações de 5 e 10mg/mL sendo que estes não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes quando comparados ao controle água (Tabela 1).

Já a experimentação com as diferentes concentrações do extrato etanólico apresentaram uma redução da germinação de (57,34%=5mg/mL, 82,34%=10mg/mL e 100%=20mg/mL). Quanto à germinabilidade, os tratamentos apresentaram diferença significativa entre si e quando comparados com o controle água. O tempo médio e velocidade média de germinação das sementes tratadas com 20mg/mL diferiram significativamente dos grupos tratados com 5 e 10mg/mL, e quando comparados com o controle água, todas as concentrações diferiram estatisticamente do mesmo (Tabela 1).

No que diz respeito aos ensaios de pós-emergência, as plântulas submetidas às diferentes concentrações do extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico (5, 10 e 20mg/mL)

diferiram significativamente quanto ao comprimento médio da radícula e do hipocótilo na medição de 48 horas quando comparadas com o controle água (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeitos das diferentes concentrações do extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico de *Tridax procumbens* na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface).

Tratamento	Extrato (mg/mL)	G±DP (%)	Tm±DP (horas)	Vm±DP (sementes/hs)	Radícula	Hipocótilo
Água	-	99,00±1,09a	14,43±1,01a	0,069±0,0046a	21,113±6,468a	3,502±0,773a
Aquoso	5	98,33±1,50a	22,70±1,24b	0,044±0,0024b	07,168±1,520b	3,605±0,863a
	10	84,00±6,81b	36,13±1,95b	0,027±0,0015c	04,172±1,116c	2,924±0,732b
	20	11,00±7,56c	45,58±1,89b	0,022±0,0009c	02,638±0,623d	1,831±0,817c
Hidroetanólico	5	92,33±3,44b	29,22±3,57b	0,034±0,0043b	06,187±1,450b	3,193±0,754b
	10	39,33±17,04c	38,88±3,54c	0,025±0,0024b	05,612±1,476c	2,808±0,542c
	20	01,00±1,67d	48,00±0,00d	0,020±0,0000c	03,853±0,914d	2,162±0,457d
Etanólico	5	42,66±18,27b	25,24±2,46b	0,039±0,0042b	08,662±2,311b	3,190±0,824b
	10	17,66±6,97c	30,40±5,29b	0,033±0,0059b	06,799±1,844c	2,909±0,560b
	20	00,00±0,00d	00,00±0,00c	0,000±0,0000c	06,831±1,552c	3,151±0,796b

Os dados são apresentados como a média ± Desvio padrão. Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Legenda: G%= porcentagem média de germinação, Tm= tempo médio de germinação e Vm= velocidade média de germinação.

### 3.2 Ensaio de pré e pós-emergência com as frações do extrato Etanólico de *T. procumbens*.

Após constatar a maior atividade biológica do extrato etanólico, foi realizado o fracionamento do mesmo e suas frações foram novamente submetidas aos ensaios de pré e pós-emergência utilizando a concentração de 4,5mg/mL para ambos os ensaios, de acordo como apresentado na Tabela 2. No ensaio de pré-emergência foi observado que apenas os tratamentos com as frações diclorometano e acetato de etila interferiram na germinação, apresentando redução respectivamente de 14,67% e 97,34% diferindo estatisticamente entre si e das outras frações, assim como do controle água. Quanto ao tempo médio de germinação, os tratamentos com as frações acetato de etila:metanol (30:70) e metanólica não apresentaram diferença estatística quando comparados com o controle, mas foram diferentes estatisticamente quando comparados com as frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila:metanol (70:30) e acetato de etila:metanol (50:50) sendo que entre estas, apenas acetato de etila diferiu estatisticamente das demais. Semelhantemente ao que foi observado para velocidade média de germinação, onde os tratamentos com as frações acetato de etila:metanol (30:70) e metanol não apresentaram diferença estatística quando comparados com o controle, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.



Com relação a atividade das diferentes frações do extrato etanólico sobre a fase inicial do desenvolvimento de plântulas de *L. sativa*, verificou-se para a medição do comprimento médio da radícula após 48 horas de exposição, que a fração diclorometano diferiu das demais, sendo as frações acetato de etila e acetato de etila:metanol (70:30) diferentes das frações acetato de etila:metanol (50:50), acetato de etila:metanol (30:70) e metanol, sendo todas as frações diferentes estatisticamente quando comparadas com o controle água. Quanto ao comprimento médio do hipocótilo, todas as frações diferiram estatisticamente quando comparadas com o controle água (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeitos das diferentes frações do extrato etanólico de *Tridax procumbens* (Diclorometano, Acetato de Etila, Acetato de Etila/Metanol 70%/30%, Acetato de Etila/Metanol 50%/50%, Acetato de Etila/Metanol 30%/70% e Metanol) na concentração de 4.5mg/mL, na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface).

Frações	G±DP (%)	Tm±DP (horas)	Vm±DP (sementes/hs)	Radícula	Hipocótilo
Água	96,66±3,05a	18,20±0,36 <sup>a</sup>	0,055±0,0011a	17,19±5,29a	3,95±0,92a
Diclorometano	85,33±5,03b	26,36±1,63b	0,038±0,0023c	08,62±1,94c	2,65±0,66c
Acetato de Etila	02,66±3,05c	41,00±9,89c	0,025±0,0061d	10,42±2,41b	3,26±0,68b
70%/30%	95,33±2,30a	24,35±1,38b	0,041±0,0024bc	11,73±2,02b	3,00±0,44bd
50%/50%	97,33±2,30a	21,94±1,84b	0,045±0,0038b	06,57±0,95d	2,94±0,41cd
30%/70%	99,33±1,15a	19,49±0,40 <sup>a</sup>	0,051±0,0011a	06,91±1,11d	3,19±0,49bd
Metanólica	98,00±2,00a	19,17±0,58 <sup>a</sup>	0,052±0,0016a	06,73±1,30d	2,84±0,63cd

Os dados são apresentados como a média ± Desvio padrão. Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Legenda: G%= porcentagem média de germinação, Tm= tempo médio de germinação e Vm= velocidade média de germinação.

### 3.3 pH, Potencial osmótico e Condutividade elétrica

Os resultados físico-químicos dos extratos de *T. procumbens* estão apresentados na Tabela 3. As diferentes concentrações dos extratos de *T. procumbens* apresentaram uma variação de pH entre 5,12 a 6,90 e para o controle água pH igual a 6,06. O potencial osmótico variou de -0,00180 a -0,01588MPa para os diferentes extratos. Já os valores médios da condutividade elétrica variaram de 1,11 a 9,07mS/cm.

**Tabela 3.** pH, potencial osmótico e condutividade elétrica dos extratos *T. procumbens* nas diferentes concentrações (5, 10 e 20mg/mL).

Extratos	Extrato (mg/mL)	pH	Potencial Osmótico (MPa)	Condutividade elétrica (mS/cm)
Água		6,06	0.0	0.014
Aquoso	5	6,90	-0,00392	2,75
	10	6,39	-0,00814	4,98
	20	6,90	-0,01444	9,07
Hidroetanólico	5	6,46	-0,00180	2,32
	10	6,67	-0,00884	4,56
	20	6,31	-0,01588	7,64
Etanólico	5	5,40	-0,00251	1,11
	10	5,30	-0,00673	1,60
	20	5,12	-0,01518	3,43

### 3.4 Índice Mitótico

O índice mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* expostas aos diferentes extratos (aquoso, hidroetanólico e etanólico) de *T. procumbens* estão apresentados na Tabela 4, apresentando respectivamente para a concentração de 20mg/mL os valores de 10,84, 08,90 e 11,30. Os três extratos não diferiram estatisticamente entre si e quando comparado com o controle positivo MMS (9,74). Somente o hidroetanólico apresentou diferença significativa quando comparado com o controle negativo (14,52). Quanto à frequência de prófases, a redução mais significativa foi observada para o tratamento com o extrato aquoso, já para a frequência de metáfase, anáfase e telófase somente o extrato hidroetanólico exibiu redução significativa da frequência de células nestas fases, quando comparadas com o controle negativo, e ainda não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle positivo.

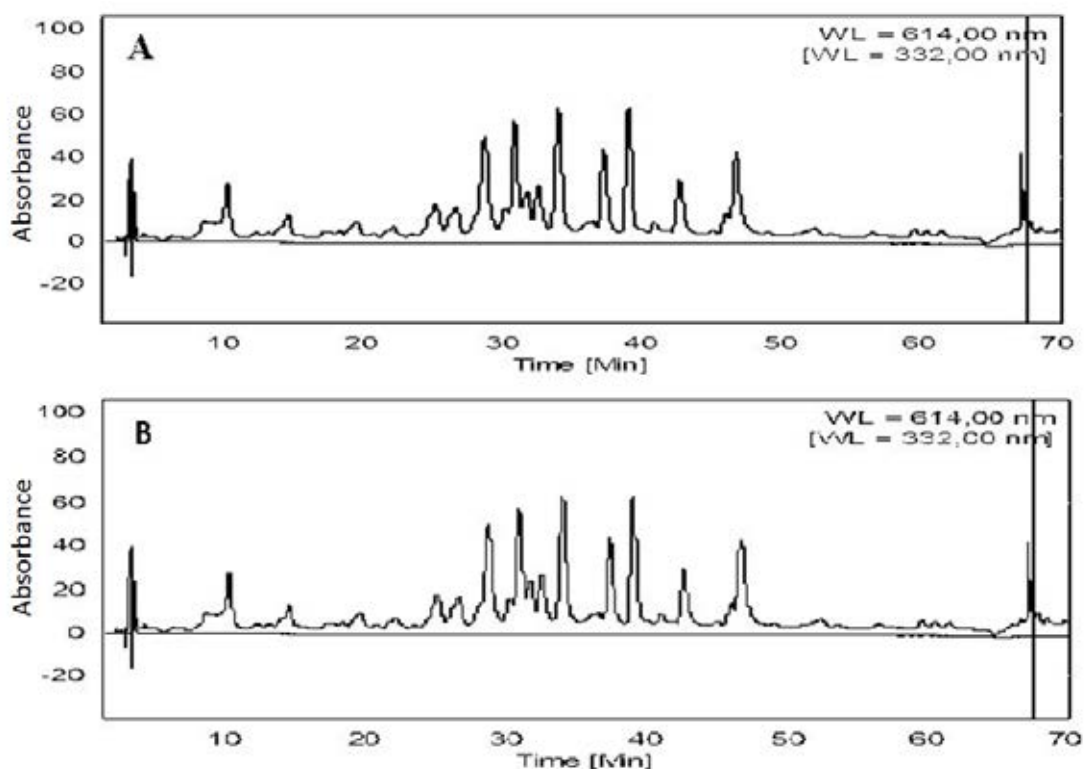
**Table 4** - Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os extratos (etanólico, hidroetanólico e Aquoso) de *T. procumbens* na concentração de 20mg/mL, controle negativo (CN) tratado como água e controle positivo tratado com 0,0077µl/mL de metilmetanosulfanado (MMS).

Diferentes extratos	Intérfase	Divisão celular				Índice Mitótico <sup>a</sup>
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
CN	3387a	386 <sup>a</sup>	70a	39a	86 <sup>a</sup>	14,52±02,17a
Etanólico	4394b	305b	96a	52a	112 <sup>a</sup>	11,30±02,63ab
Hidroetanólico	4473b	274b	64b	25b	82b	08,90±00,79b
Aquoso	4383b	290b	104a	46a	102 <sup>a</sup>	10,84±01,86ab
MMS	4353b	322b	65b	23b	77b	09,74±02,50b

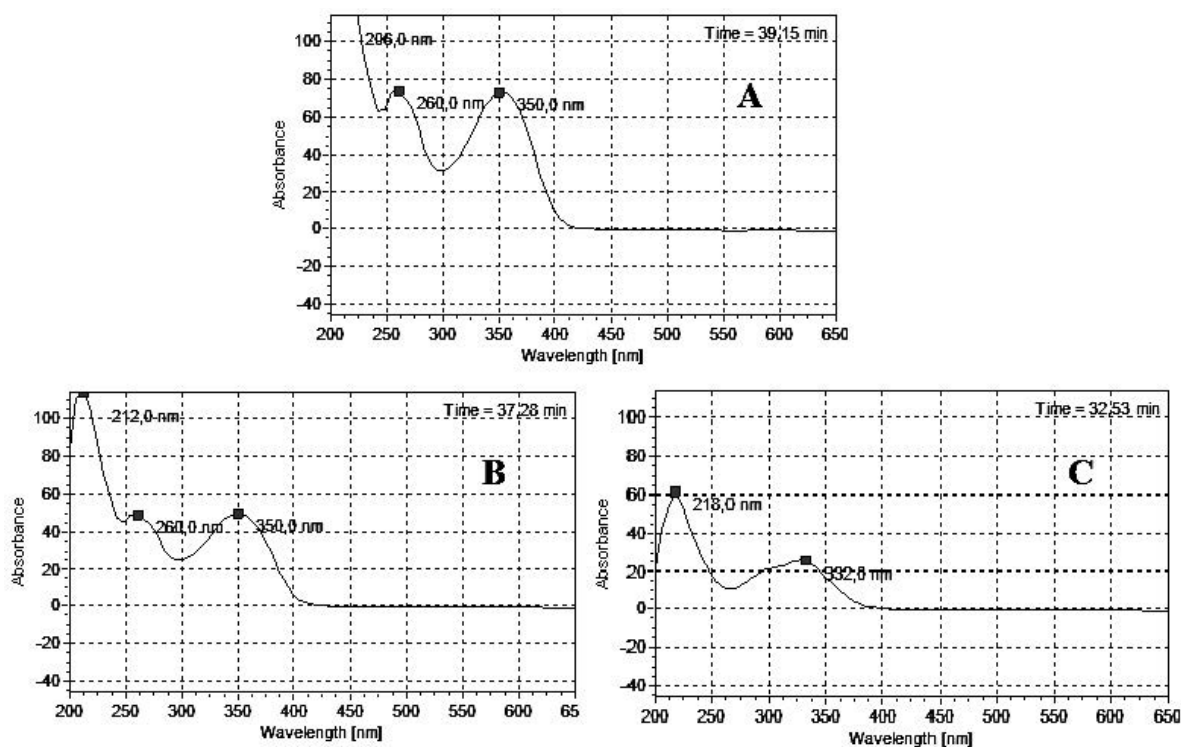
<sup>a</sup>Índice Mitótico = (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PAD)

O *screening* por HPLC-PAD do extrato etanólico de *T. procumbens* e da fração acetato de etila do mesmo (Figuras 1A e B), mostrou um perfil cromatográfico muito similar, com metabólitos detectados com polaridade parecida quando utilizada a coluna C18 com 250x4.6 mm i.d. de partículas com tamanho médio de 5 $\mu$ m, indicando que o extrator acetato de etila teve maior afinidade devido à sua polaridade com a maior parte dos compostos do extrato etanólico. Com auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600nm, obteve-se espectros na região do UV para os picos eluídos. Podem ser observados picos com bandas de absorção típicos de flavonoides (Figura 2A), os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximo de comprimento de onda na faixa espectral de 240-290nm, atribuída ao anel-A e a Banda I, com máximo de comprimento na faixa espectral de 300-390nm, atribuída ao anel-B, apresentando maior incidência de moléculas do grupo das flavonas e flavonóis (Figuras 2B e C).



**Figura 1.** (A) Perfil cromatográfico do extrato etanólico obtido por HPLC-PAD. (B) Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do extrato etanólico obtido por HPLC-PAD. Sistema de eluição: A (Acetonitrila + 0,1% Ác. Fórm.) e B (Água + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 10-35% de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex® Luna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm i.d., 5 $\mu$ m), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$ = 334 nm, Volume de injeção: 20 $\mu$ L. Forno de coluna: 40°C.



**Figura 2.** (A) Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonoides, (B) Espectro UV típico de um flavonol e (C) Espectro UV típico de uma flavona.

#### 4. Discussão

De acordo com Lorenzi, (1991) e Kissmann e Groth, (1999) *Tridax procumbens* é uma importante planta invasora e daninha, infesta pastagens, beiras de estradas, terrenos desocupados e áreas urbanas, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Trabalho realizado por Vivian et al. (2013) demonstrou que esta espécie teve disseminação muito rápida nas áreas de culturas anuais, nos cerrados do Centro-Oeste brasileiro. Já, estudos recentes realizados por Jachak et al. (2011), Christudas et al. (2012), Algariri et al. (2013) e Policegoudra et al. (2014), apresentam diferentes aplicações desta espécie em estudos da atividade biológica e farmacológica.

Dentro deste contexto, Silva et al. (2014) consideram que para a detecção do potencial fitotóxico de um determinado extrato vegetal os ensaios de pré e pós-emergência são válidos e confiáveis. Nesse sentido, os ensaios de pré-emergência realizados, demonstraram que os extratos nas diferentes concentrações e a fração acetato de etila do extrato etanólico alteraram significativamente todos os índices analisados para a planta alvo (Tabelas 1 e 2), corroborando com o demonstrado por Inderjit e Nilsen (2003) que evidenciaram que aleloquímicos podem ter ação fitotóxica interferindo em atividades metabólicas essenciais, causando assim alterações no processo de germinação. Alterações significativas também

foram observadas para os ensaios de crescimento, onde as plântulas apresentaram inibição deste índice, tanto para radícula como hipocótilo, nos mesmos tratamentos utilizados na pré-emergência (Tabelas 1 e 2), demonstrando relação com a ação fitotóxica já relatada para alguns aleloquímicos em testes de crescimento de plantas como os realizados por Silva et al. (2013), Poonpaiboonpipat et al. (2013) e Silva et al. (2014). Em ambos os ensaios foi observado um aumento da atividade biológica com o aumento das concentrações, assim demonstrando uma atividade dose dependente como verificado nos trabalhos realizados por Jinhu et al. (2012) e Tigre et al. (2012). Neste sentido, pesquisas preliminares realizadas por Krautmann, et al. (2001) e Femina et al. (2012) indicaram uma possível atividade biológica de *T. procumbens* sobre o desenvolvimento de plantas, dados que corroboram com os resultados apresentados no presente estudo.

Estudos fitotóxicos realizados com extratos vegetais mostram que soluções aquosas podem proporcionar alterações de pH, potencial osmótico e condutividade elétrica no meio e interferir diretamente na capacidade de germinação e no desenvolvimento das plântulas testadas, sendo muitas vezes o efeito fitotóxico caracterizado de maneira errônea, destacando a importância de caracterizações físico-químicas, assim, Gatti et al. (2004) recomendam que o potencial osmótico dos extratos envolvidos nos testes de germinação não excedam um valor de -0,2 MPa (Tabela 3).

Os diferentes extratos de *T. procumbens* apresentaram variação de pH 5,12 - 6,90 (Tabela 3), sendo que estes estão dentro do intervalo de valores que não influenciam o processo de germinação, como demonstrado por Baskin e Baskin (1998) e Carmo et al. (2007), que avaliaram a germinação de alface em uma ampla gama de valores de pH de 3,0 a 7,0. A condutividade elétrica dos diferentes extratos nas diferentes concentrações, apresentaram-se dentro do estabelecido por Souza et al. (2003), que verificou que valores abaixo de 20mS/cm não são prejudiciais para a germinação de sementes.

O potencial fitotóxico também foi observado quando analisado o índice mitótico em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, pois os tratamentos com os diferentes extratos apresentaram atividade mitodepressiva (Tabela 4). Efeitos similares a este foram observados por Batish et al. (2006) e Pinho et al. (2010). Além disso, e de acordo com Salehzadehetal, (2003) a redução das taxas de divisão celular pode estar diretamente relacionada com o fato de muitas células terem sido retidas no estágio de interfase, encontrando relatos mostrando que a fase de síntese do DNA (S) e GAP 2 (G2) são as comumente alteradas por substâncias químicas, capazes de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio que podem provocar danos no DNA e na síntese de proteínas.

A análise dos possíveis compostos envolvidos com o potencial fitotóxico foi realizada por meio de HPLC-PAD tanto do extrato etanólico quanto da sua fração acetato de etila (Figura 1), sendo que esta análise apresentou um perfil cromatográfico muito similar entre o extrato e a fração. A varredura foi realizada na região do UV onde foi possível verificar, picos com bandas de absorção típicas de flavonoides (Figura 2A) os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel-B. De acordo com estudos realizados por Mabry et al. (1970), Merken e Beecher, (2000), Saldanha, (2013) estas faixas espectrais correspondem à presença de moléculas do grupo das flavonas e flavonóis os quais são reconhecidos por exibirem picos para a banda II em torno de 240-280 nm e picos de banda I em torno 300-380 nm (Figura 2B e 2C). O potencial fitotóxico de muitos compostos, entre eles os flavonoídicos, é reconhecido, pois, conforme demonstrado por Yu et al. (2003), os mesmos podem afetar a permeabilidade da membrana, promover danos ao DNA e às proteínas e provocar a peroxidação lipídica, conduzindo à morte celular. Semelhantemente, Sanevas et al. (2007) verificaram que o extrato de algas induziu estresse oxidativo em plântulas de cebola e trigo. Outro exemplo e um dos mais bem caracterizados é o da atividade da sorgolene capaz de inibir a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II ocasionando estresse oxidativo, como demonstrado por Czarnota et al. (2001).

Estes dados corroboram estudos anteriores realizados por Saraf et al. (1991) e Jude et al. (2009), que destacaram a presença de flavonoides em extratos de *T. procumbens*. Já Jachak et al. (2011) demonstraram a presença de centaurein e bergenina, dois compostos flavonoídicos, sendo a atividade anti-inflamatória, observada neste estudo, atribuída em parte a presença deste compostos. Sailaja et al. (2011) observaram a atividade antioxidante para esta planta, assim como também relatado anteriormente por Agrawal et al. (2008) em seu estudo com diferentes extratos de *T. procumbens*.

Considerando os resultados obtidos nos diferentes ensaios bem como a caracterização fitoquímica dos extratos e frações, é possível concluir que esta espécie possui compostos com potencial fitotóxico, capazes de interferir no processo de germinação, desenvolvimento e estabilização de outras espécies. Sendo assim, de acordo com a caracterização fitoquímica e com os estudos encontrados na literatura é possível sugerir que a ação observada esteja relacionada com a presença de compostos flavonoídicos, devido à sua predominância no extrato etanólico e na fração acetato de etila do mesmo, onde foi observada maior atividade biológica nos ensaios avaliados.

## 5. Agradecimentos

Os autores são gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## 6. Referências

Algariiri, K., Meng, K.Y., Atangwho, I.J., Asmawi, M.Z., Sadikun, A., Murugaiyah, V., Ismai, N., 2013. Hypoglycemic and anti-hyperglycemic study of *Gynura procumbens* leaf extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3, 358-366.

Agrawal, S.S., Talele, G.S. 2011. Bioactivity guided isolation and characterization of the phytoconstituents from the *Tridax procumbens*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 1, 58-62.

Agrawal, S.S., Talele, G.S., Surana, S.J. 2009. Antioxidant Activity of Fractions from *Tridax procumbens*. *J. Pharmacy Research.* 2, 71-73.

Alves, M.C.S., Filho, S.M., Innecco, R., Torres, S.B. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, *Pesqui. Agropecu. Brás. Brasília.* 39, 11, 1083-1086.

Bártová, K., Hilscherová, K., Babica, P., Maršálek, B. 2011. Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *J Appl Phycol.* 23, 967–973.

Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. *Seeds – Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination.* Academic Press, San Diego.

Batish, D.R., Gupta, P., Singh, H.P., Kohli, R.K., 2006. l-DOPA (l-3,4-dihydroxyphenylalanine) affects rootings potential and associated biochemical changes in hypocotyl of mung bean, and inhibits mitotic activity in onion root tips. *Plant Growth Regul.* 49, 229–235.

Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L., Takaki, M., 2007. Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer aqueous extracts. *Acta Bot. Bras.* 21, 697–705.

Carvalho, S.J.P., Nicolai, M., Ferreira, R.R., Figueira, A.V.O., Christoffoleti, P.J. 2009. Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. *Sci. Agric. Piracicaba.* 66, 1.

Chou, C.H., Kuo, Y.L. 1986. Allelopathic research of subtropical vegetation in taiwan. III. Allelopathic exclusion of understorey by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *J. Chem. Ecol.* 12, 1431-1448.

Christudas, S., Kulathivel, T.M., Agastian, P., 2012. Phytochemical and antibacterial studies of leaves of *Tridax procumbens* L., *Asian Pac J Trop Biomed,* S159-S161.

Costa, R.M.A., Menk, C.F.M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento.* 3, 12, 24-26.

Czarnota, M.A., Paul, R.N., Dayan, F.E., Nimbale, C.I., Weston, L.A. 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. *Weed Technol.* 15, 813-825.

El Marsni, Z., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macias, F.A., Ossa, E.J.M., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M. 2011. Potential allelopathic of the fractions obtained from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* 60, 28–37.

Femina, D., Lakshmi Priya, P., Subha., Manonmani, R. 2012. Allelopathic effects of weed (*Tridax procumbens*) extract on seed germination and seedling growth of some leguminous plants. *IRJP.* 3, 90-95.

Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A., Lima, M.I.S., 2004. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. *Acta Bot. Bras.* 18, 459–472.

Gniazdowska, A., Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiol Plant.* 27, 3, 395-407.

Guimaraes, S.C., Hrycyk, M.F., Mendonca, E.A.F. 2007. Efeito de fatores ambientais sobre a seletividade do alachlor ao algodoeiro. *Planta daninha, Viçosa.* 25,dez, n.4.

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., MohammadI, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., Nafissi-Varcheh, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol.* 22, 43–50.

IBGE, 2009. Brazilian Institute of Geography and Statistics.

Inderjit and Callaway R.M. 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant Soil.* 256, 1-11.

Inderjit and Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L. 1999. Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions. Boca Raton, CRS Press. 589.

Inderjit and Nilsen, E.T. 2003 Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 22, 221-238.

Jachak, S.M., Gautam, R., Selvam, C., Madhan, H., Srivastava, A., Khan, T. 2011. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. *Fitoterapia.* 82, 173–177.

Jinhu, M., Guofang, X., Wenxiu, Y., Leilei, M., Mei, G., Yuguo, W., Yuanhuai, H. 2012. Inhibitory effects of leachate from *Eupatorium adenophorum* on germination and growth of *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium glaucum*. *Acta Ecol Sin.* 32, 50–56.

Jude, C.K., Catherine, C.I., Ngozi, M.I. 2009. Chemical Profile of *Tridax procumbens* Linn. *Pak. J. Nutr.* 8, 5, 548-550.

Kato-Noguchi, H., Tamura, K., Sasaki, H., Suenaga, K. 2012. Identification of two phytotoxins, blumenol A and grasshopper ketone, in the allelopathic Japanese rice variety Awaakamai. *J. Plant. Physiol.* 169, 682–685.

Kissmann, K.G., Groth, D. 1999. *Plantas Infestantes e Nocivas.* 2.ed. São Paulo, BASF, Tomo III. 978

Krautmann, M.; Turbay, S.; Riscala, E. 2001. Efectos Alelopáticos de *Tridax Procumbens* L. *Revista Dominguezia.* 17, 1, 13-22.

Labouriau, L.F.G. 1983. A germinação das sementes. Washington: Departamento de Assuntos Científicos e Tecnológicos da Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. Série Biologia, monografia, 24, 174.

Leflaive, J., Ten-hage, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52, 199-214.

Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research.* 682, 71–81.

Lorenzi, H. 2000. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais.* 3 ed. Nova Odessa, ed. Plantarum, 608.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids,* Springer-Verlag, New York.

Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Galindo, J.C.G. 2007. Allelopathy - A natural alternative for weed control. *Pest Management Science.* 63, 327-348.



- Martins, D., Triguero, L.R.C., Domingos, V.D., Martins, C.C., Marchi, S.R., Costa, N.V. 2007. Seletividade de herbicidas aplicados em pós-emergência sobre capim-braquiária. R. Bras. Zootec. 36, dez., n. 6.
- Mascarenhas, R.E.B., Modesto Júnior, M.S., Dutra, S., Souza Filho, A.P.S. 1999. Plantas daninhas de uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense. Planta Daninha. 17, 3, 399-418.
- Mazzafera, P. 2003. Efeito alelopático do extrato aquoso de cravo-da-india e eugenol. Rev. Bras. Bot. 26, 2, 231-238.
- Merken, H.M. and Beecher, G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. J. Agric. Food Chem. 28, 3, 577-599.
- Miró, C.P., Ferreira, A.G., Áquila, M.E.A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. Pesqui. Agropecu. Brás. 33, 8, 1261-1270.
- Modesto Júnior, M.S., Mascarenhas, R.E.B. 2001. Levantamento da infestação de plantas daninhas associadas a uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense. Planta Daninha, 19, 1, 11-21.
- Morel, P., Guillemain, G. 2004. Assessment of the possible phytotoxicity of a substrate using an easy and representative biotest. Acta Hort. 644, 417-423.
- Noldin, V.F., Monache, F.D., Yunes, R.A. 2003. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. Quim Nova, São Paulo. 26, 3, 331-334.
- Pereira, R.S., Santana, D.G., Ranal, M.A. 2009. Seedling emergence from newly-collected and storage seeds of copaifera langsdorffii Desf. (caesalpinoideae), triângulo mineiro, Brazil. Ver. Arvore. 33, 643-652.
- Pinho, D.S., Sturbelle, R. T., Martino-Roth, M.G., Garcias, G. L. 2010. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos Rev. Bras. Farmacogn. 20, 2, 165-170.
- Policegoudra, R.S., Chattopadhyay, P., Aradhya, S.M., Sivaswamy, R., Singh, L., Vee, V., 2014. Inhibitory effect of *Tridax procumbens* against human skin pathogens. J. Herb. Med. 3, 1-17.
- Poonpaiboonpipat, T., Pangnakorn, U., Suvunnamek, U., Teerarak, M., Charoenying, P., Laosinwattana, C. 2013. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). Ind Crop Prod. 41, 403- 407.
- Procópio, S.O., Santos, J.B., Silva, A.A., Pires, F.R., Ribeiro, J.I.J., Santos, E.A. 2005. potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-Sodium. Plantas Daninhas. 23, 1, 9-16.
- Sailaja, B., Bharathi, K., Prasad, K.V.S.R.G. 2011. Protective effect of *Tridax procumbens* L. on calcium oxalate urolithiasis and oxidative stress. Pharnanest, 2, 9-14.
- Salahdeen, H.M., Yemitan O.K., Alada, A.R.A. 2004. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Tridax Procumbens* On Blood Pressure And Heart Rate In Rats. Afr. J. Biomed. Res. 7, 27-29.
- Saldanha, L.L. 2013. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Tese (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 161.
- Salehzadeh, A., Akhkha, A., Cushley, W., Adams, R. L. P., Kusel, J.R., Strang, R.H.C., 2003. The antimutagenic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 681-689.
- Sanevas, N., Sunohara, Y., Matsumoto, H. 2007. Characterization of reactive oxygen species-involved oxidative damage in *Hapalosiphon* species crude extract-treated wheat and onion roots. Weed Biol. Manag. 7, 3, 172-177.
- Santana, D.G., Ranal M.A. 2004. Análise da germinação: Um enfoque estatístico. Brasília-DF, Editora UNB. 1, 247.

- Saraf, S., Pathak, A.K., Dixit, V.K. 1991. Hair growth promoting of *T. procumbens*. *Fitoterapia*. LXII, p. 495–498.
- Sharma, B., Kumar, P. 2009. Extraction and Pharmacological Evaluation of Some Extracts of *Tridax procumbens* and *Capparis decidua*. *Int J Applied Res Nat Prod*. 1, 4, 5-12.
- Silva, R.M.G., Brigatti, J.G.F., Santos, V.H.M., Mecina, G.F., Silva, L.P. 2013. Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. *Sci. Hortic*. 158, 39–44.
- Silva, R.M.G., Brante, R.T., Santos, V.H.M., Mecina, G.F., Silva, L.P. 2014. Phytotoxicity of ethanolic extract of turnip leaves (*Raphanus sativus* L.). *Biosci. J*. 30, 3, 891-902.
- Soares, G.L.G., Vieira, T.R. 2000. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. “Grand Rapids”) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. *Floresta. Ambient*. 7, 1, 180-197.
- Souza, L.S., Velini, E.D., Maiomoni-Rodella, R.C.S., 2003. Allelopathic effect of weeds and concentrations of *Brachiaria decumbens* on the initial development of eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Planta Daninha* 21, 343–354.
- Souza Filho, A.P.S., Alves, S.M. 2002. Mecanismos de ação dos agentes alelopáticos. In: Souza Filho, A.P.S., Alves, S.M. editores. *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém :Embrapa Amazônia Oriental. 131-154.
- Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C. 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 84, 125–132.
- Tiwari, U., Rastogi, B., Singh, P., Saraf, D.K., Vyas, S.P. 2004. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 92, 13-119.
- Villela, F.A., Doni Filho, L., Sequeira, E.L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesqui. Agropecu. Bras*. 26, 1957-1968.
- Vivian, R., Dourado-Neto, D., Silva, A.A. 2013. Victoria Filho, R., Yeda, M.P., Ruiz-Corrêa, S. Growth Analysis of Coatbutton in Competition with Soybean under Water Deficit. *Planta Daninha*. 31, 3, 599-610.
- Yu, J.Q., Ye S.F., Zhang, M.F., Hu, W.H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochem Syst Ecol*. 31,129-139.
- Zak, A., Musiewicz, K., Kosakowska, A. 2011. Allelopathic activity of the Baltic cyanobacteria against microalgae. *Estuar. Coast. Shelf Sci*. 1-7.

## Capítulo 2

Fitotoxicidade de extratos e frações de *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl.  
(Ochnaceae).

G.F. Mecina<sup>(a)</sup>, V.H.M. Santos<sup>(b)</sup>, A.L.D. Bosqueiro<sup>(c)</sup>, L.L. Saldanha<sup>(c)</sup>, L.P. Silva<sup>(a)</sup>, R. M.G. Silva<sup>(a\*)</sup>.

<sup>(a)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

<sup>(b)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, Fisiologia Vegetal, Distrito de Rubião Jr., s/nº, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>(c)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Ciência Biológica, CEP 17033-360, Bauru, São Paulo, Brazil.

\* Autor para correspondência Tel.: +5518; fax: +5518  
e-mail: regildos@yahoo.com.br

**Resumo:** Entre as inúmeras espécies vegetais ocorrentes no cerrado, *Ourotea spectabilis* destaca-se, pois abaixo de sua copa não ocorre o desenvolvimento de outras espécies vegetais. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar o potencial fitotóxico dos diferentes extratos e frações do extrato hidroetanólico de folhas de *O. spectabilis* por meio dos bioensaios laboratoriais de pré e pós-emergência em sementes de *Lactuca sativa* L., determinação do índice mitótico em células de raízes de *Allium cepa* L., atividade antioxidante e realização da triagem das diferentes classes fitoquímicas presentes nos extratos e fração acetato de etila. Foi possível verificar que os diferentes extratos e fração acetato de etila de *O. spectabilis* interferiram no índice de germinação, apresentando redução da germinação quando comparados com o controle. Semelhantemente foi observado no crescimento e desenvolvimento de plântulas de alface, os diferentes extratos da espécie reduziram o tamanho da raiz primária e do hipocótilo quando comparada com o controle. No índice mitótico houve uma redução dos grupos tratados em comparação ao controle negativo. Quanto à análise realizada em HPLC-PAD, tanto para o extrato hidroetanólico quanto em sua fração acetato de etila, a predominância de compostos flavonoídicos foi observada, sendo identificada a presença de compostos pertencentes ao grupo das isoflavonas e catequinas. Sendo assim foi possível concluir que esta espécie possui compostos fitotóxicos capazes de interferir na estabilização e no desenvolvimento de outras espécies.

Palavras chave: Fitotóxico; Alelopatia; Aleloquímicos; HPLC-PAD; *Allium cepa*; DPPH.

## 1. Introdução

Atualmente há um esforço crescente no estudo da agricultura sustentável, estando no centro das discussões as preocupações com os efeitos adversos da utilização extensiva de produtos químicos sintéticos, tais como o aumento da resistência de cultivares a herbicidas e a contaminação do solo e água (Jinhu et al., 2012; Tigre et al., 2012). Sendo assim, o interesse em compostos alternativos com propriedades fitotóxicas tem crescido nas últimas décadas, proporcionando um campo promissor para a descoberta de praguicidas de origem natural que hajam diretamente sobre as ervas daninhas, e o mais importante, que não acarretem futuros problemas ao meio ambiente e a saúde humana (Alves et al., 2003; Haig et al, 2009).

Um fenômeno fitotóxico que pode ser observado na natureza em diversos biomas é a alelopatia. Tal interação ecológica pode ser definida como a influência de um organismo sobre o outro podendo favorecer ou não o organismo alvo, ocorrendo de maneira indireta ou direta, sendo estas interações mediadas por biomoléculas chamadas de aleloquímicos (Rice, 1984; Rizvi et al., 1992; Ferreira e Aquila, 2000; Silva e Aquila, 2006, Inderjit et al., 2011). No cerrado, a alelopatia é responsável pelas interações interespecíficas e intraespecíficas na estabilização e manutenção das diferentes formas de vida presentes neste bioma (Jeronimo et al., 2005; Aires, 2005).

Entre inúmeras espécies de vegetais ocorrentes no cerrado *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. da família Ochnaceae é conhecida popularmente como “folha-de-serra”; destaca-se pelos relatos populares por possuir uma característica ecológica peculiar, pois abaixo de sua copa não ocorre o desenvolvimento de outras espécies vegetais. Esta espécie é uma planta decídua, heliófita, indiferente quanto às condições de solo, ocorrente nos biomas cerrado e campos cerrados do Brasil. Na medicina popular é utilizada para tratar distúrbios gástricos e reumáticos (Paulo et al., 1986). Estudo fitoquímico de extrato desta espécie revelou a presença de bigenkanina e metoxiflavona demonstrando capacidade para a produção de metabolitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética e agrícola (Felício, 1995).

Diante da possível capacidade de síntese de compostos aleloquímicos e das características ecológicas desta espécie, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a fitotoxicidade de diferentes extratos e frações do extrato hidroetanólico de folhas de *O. spectabilis* por meio dos bioensaios laboratoriais de pré e pós-emergência em sementes de *Lactuca sativa* L., determinação do índice mitótico em células de raízes de *Allium cepa* L., atividade antioxidante e realização da triagem das diferentes classes fitoquímicas presentes nos extratos e fração acetato de etila.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal e preparação dos extratos**

As folhas de *Ouratea spectabilis* foram coletadas de espécimes presentes na Universidade Estadual Paulista – Assis – SP (22°39'42''S e 50°24'44''W, Altitude: 546m). O voucher da espécie *O.spectabilis* está depositado no herbário do Instituto Florestal de São Paulo (SPSF) subnúmero 70323. Para preparação dos extratos as folhas foram lavadas, secas em estufa (40°C) e pulverizadas. O extrato aquoso foi obtido por agitação mecânica, em água destilada [proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas a 24°C]. Logo após foi filtrado a vácuo, congelado e liofilizado (modelo: L101, Lítotop, Brasil) para obtenção do extrato seco. O extrato hidroetanólico foi obtido por agitação mecânica em uma solução de etanol: água (70:30) na proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas, o processo foi repetido por 3 vezes com mesmo material vegetal. Logo após, o extrato obtido foi filtrado e levado ao evaporador rotativo (modelo: MA120, Marconi, Brasil) a 60°C para retirada do etanol e posteriormente congelado e liofilizado para obtenção do extrato seco. Semelhantemente foi obtido o extrato etanólico substituindo a solução etanol: água (70:30) por etanol absoluto (IMPEX, Brazil), sendo que o extrato seco foi obtido após concentração em evaporador rotativo seguido de câmara de dessecação a temperatura ambiente.

### **2.2 Bioensaio de Alelopatia para Pré-emergência**

O bioensaio de pré-emergência foi realizado com sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids (Alface) por meio do controle da germinação das sementes destas plantas em placa de *Petri* (60 mm × 15 mm) e papel de germinação, com umidade relativa, temperatura e luminosidade controladas artificialmente em estufas de Germinação tipo BOD (Biological Oxygen Demand) (model: 411/FPD, Nova Ética, Brazil). Para tanto foi montado um experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde placas de *Petri* foram separadas em grupos experimentais e controle, contendo 50 sementes de alface em cada placa, com seis repetições para cada grupo experimental, tratados com os diferentes extratos *O. spectabilis* (nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL), posteriormente foi realizado com as frações do extrato com maior bioatividade, e um grupo controle negativo (água). Como critério para avaliação da germinação foi utilizado à protrusão e a curvatura geotrópica da radícula, conforme indicado por Labouriau (1983). As sementes que apresentaram falsa germinação por embebição não foram contabilizadas nos resultados. O monitoramento da germinação das espécies foi feito a cada 06 horas, durante 48 horas.

Para os resultados obtidos nos ensaios diferentes índices foram calculados: porcentagem média de germinação ( $(\sum ni/A) \cdot 100$ ), tempo médio de germinação ( $T_m = [\sum ni \cdot ti] / \sum ni$ ) e velocidade média de germinação ( $V_m = 1/T_m$ ) sendo  $n_i$  = Número de sementes germinadas em cada instante “ $t_i$ ”;  $A$  = Número total de sementes colocados para germinar; e  $t_i$  = Tempo entre o início do experimento e a hora  $i$ -th da observação (Santana e Ranal, 2004, Pereira et al., 2009).

### **2.3 Bioensaio de Alelopatia para Pós-emergência**

O bioensaio foi realizado conforme metodologia proposta por Soares (2000) e Alves e colaboradores (2004) e adaptado às nossas condições laboratoriais. As sementes de alface foram previamente germinadas em placas de *Petri*, forradas com papel de germinação umedecido com água destilada. Depois de 24hs em condições de estufa BOD, as plântulas que apresentaram em média 2mm de comprimento foram utilizadas no bioensaio, que foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com placas de *Petri* contendo como substrato papel de germinação, umedecidos com 1mL da solução das diferentes concentrações dos extratos de *O. spectabilis* e posteriormente foi realizado com as frações do extrato com bioatividade. Estas foram separadas em grupos experimentais e controle, contendo 25 plântulas em cada placa, com quatro repetições para cada tratamento e para o controle (água).

O seguimento evolutivo dos tratamentos foi realizado pela observação e medição das radículas e hipocótilo das plântulas, por meio de um paquímetro digital (model: IP65, DIGIMESS®, Brazil), a cada 24 horas até completar 48 horas de exposição (MIRÓ et al., 1998; PROCOPIO et al., 2005).

### **2.4 Tratamento estatístico para os testes de pré e pós-emergência**

Para o tratamento estatístico dos testes de pré e pós-emergência foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade (Levene). Os dados não apresentaram normalidade e suas variâncias não foram homogêneas, assim os resultados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e Dunn ( $\alpha=0,05$ ) com auxílio do software BioEstat 5.3, de acordo com o proposto por Santana e Ranal, (2004).

### **2.5 Fracionamento do extrato**

O extrato bruto hidroetanólico das folhas de *O. spectabilis* foi submetido ao fracionamento, pois apresentou a maior atividade alelopática nos ensaios de pré e pós-emergência. Para tanto uma coluna cromatográfica foi montada com cerca de 75% de Sílica

Gel 60 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) e 25% de Sílica Gel 60 incorporada com 2,0g de extrato. A sequência de solventes para a eluição foi: n-Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, Acetato de Etila:Metanol (70:30), Acetato de Etila: Metanol (50:50), Acetato de Etila: Metanol (30:70) e Metanol. As mudanças de solventes foram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência de separação. As frações filtradas foram concentradas no evaporador rotativo a 40±2°C. Em seguida, foram submetidas ao bioensaio tanto para pré como pós-emergência.

## **2.6 Determinação do potencial osmótico, pH e condutividade elétrica**

A determinação do potencial osmótico foi realizado de acordo com técnica descrita por Villela et al. (1991). O tratamento foi avaliado por soluções osmóticas obtidas com o uso de Polietileno glicol 6000 (PEG 6000) nas quantidades indicadas para estabelecer os potenciais osmóticos de -0,02 a -1,0MPa. Os valores dos potenciais osmóticos obtidos nas soluções de PEG6000 foram comparados com os valores encontrados nas diferentes concentrações dos extratos de *O. spectabilis*.

O pH das diferentes concentrações dos extratos e fração acetato de etila de *O. spectabilis* foram determinado utilizando um pHmetro (Tecnopon<sup>®</sup> modelo MPA210). De modo semelhante, a condutividade elétrica foi medida com um medidor de condutividade (Medidor de Condutividade Instrutherm<sup>®</sup>, modelo CD860).

## **2.7 Índice mitótico em células de raiz de *Allium cepa***

Sementes de *Allium cepa* (cebola) foram previamente germinadas em placas de *Petri*, quando as raízes das plântulas atingiram 1cm de comprimento foram expostas aos extratos nas concentrações que apresentaram maior atividade nos experimentos de pré e pós-emergência, por um período de 48 horas, após este período foram recolocadas em placa de *Petri* contendo água destilada até atingirem 5cm médio de comprimento (período de recuperação). Todo o experimento foi realizado em condições de estufas de germinação tipo BOD. As raízes foram fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto e ácido acético glacial, 3:1). Para montagem e análise das raízes, as mesmas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C, durante 8 minutos, e posteriormente foram coradas em Reativo de Schiff por 2horas ao abrigo da luz. As raízes foram colocadas sobre lâminas e adicionado uma gota de Carmin acético 2% e cobertas por lamínulas. Foram esmagadas e fixadas. As análises foram realizadas em microscópio óptico (100x). Foram observadas 5000 células/ tratamento. Os efeitos fitotóxicos dos extratos foram determinados pela análise do índice mitótico (n° total de células em



divisão/nº total de células analisadas x 100). Para o análise estatística do ensaio de *A. cepa* os resultados foram submetidos aos testes não paramétricos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (nível de significância da análise de 5% e 1%) de acordo com Leme e Marin-Morales (2009).

## 2.8 Teste da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos e fração acetato de etila foi determinada pela capacidade doadora de H<sup>+</sup> para o radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH, Sigma, USA), de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Blios (1958). O experimento foi realizado em triplicata, utilizando a solução de 1mL de tampão acetato (pH 5,5 e 100mM), 1,25mL de etanol P.A., 250µL de solução de DPPH e 50µL das amostras. O extrato reagiu com o radical DPPH por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade e em seguida foi submetido ao espectrofotômetro UV-Vis (Femto-600 Plus) a um comprimento de onda de 517nm. (Brand-Williams et al., 1995). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%)=[(controle-amostra)/controle]x100. O potencial antioxidante do extrato pode ser visto pelo grau de descoloração do reagente após os 30 minutos necessários para a reação atingir o estado de plateau, além do baixo valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, a capacidade do extrato inibir a oxidação do radical em 50% (Di MAMBRO e FONSECA, 2005). O ácido gálico (Vetec Química Fina-, Brasil) foi utilizado como padrão.

## 2.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089S Plus (Jasco<sup>®</sup>), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 200 - 900 nm, modelo MD-2015 Plus (Jasco<sup>®</sup>), injetor automático modelo AS-2055 (Jasco<sup>®</sup>) com *loop* de 50 mL e forno de coluna modelo CO-2060 Plus. O software Jasco *ChromPass* (Versão 1.8.1.6) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados cromatográficos. Foi usada uma coluna de fase reversa imobilizada com octadecilsilano, modelo Luna C<sub>18</sub> (2) 100A (Phenomenex<sup>®</sup>) de 250 x 4,6 mm i.d., com partículas com tamanho médio de 5 µm com coluna de guarda (Phenomenex<sup>®</sup>) de 4x3 mm i.d.. Uma alíquota de 10 mg do extrato hidroetanólico e da fração acetato de etila foram dissolvidas em 1 mL de ACN 100% e filtrada em filtro de seringa com poro de 0,45 µm. As amostras foram monitoradas por detector PDA na faixa de 200-600 nm. O cromatograma foi obtido em 254 nm. Fase móvel: Acetonitrílica + 0,1% Ác. Fórmico (A) e Água + 0,1 % de Ác. Fórmico. Gradiente: 10-30% de A em B em 60 min.

### 3. Resultados

#### 3.1 Ensaio de pré-emergência e pós-emergência com os extratos de *O. spectabilis*.

No ensaio de pré-emergência em sementes de *Lactuca sativa*, o extrato aquoso reduziu significativamente a taxa de germinação para o tratamento com a concentração de 20mg/mL (53,34%) quando comparada ao controle (99,33%). Quanto ao tempo médio e à velocidade média de germinação os tratamentos com as concentrações de 10 e 20mg/mL não apresentaram diferença estatística entre si, mas foram significativamente diferentes quando comparadas com as sementes tratadas com 5mg/mL e o grupo controle, sendo que estas também não apresentaram diferença entre si (Tabela 1).

Para os ensaios com os extratos hidroetanólico e etanólico um padrão similar foi observado, apresentando para as concentrações de 5 e 10mg/mL, diferença significativa quando comparadas com as tratadas com 20mg/mL que apresentou redução na taxa de germinabilidade (hidroetanólico=22,67% e etanólico=10,00%), sendo estas diferentes estatisticamente do controle (99,33%). Para o tempo médio e velocidade média de germinação, as sementes tratadas com 5mg/mL do extrato etanólico foram significativamente diferentes em relação as tratadas com 10 e 20mg/mL, sendo que estas não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes quando comparadas com o controle. Já para o extrato hidroetanólico verificou-se que as três concentrações apresentaram-se diferentes estatisticamente entre si sendo a concentração de 5mg/mL a única que não diferiu do controle (Tabela 1).

Para o ensaio de pós-emergência as diferentes concentrações do extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico diferiram significativamente entre si e quando comparados com o controle em relação ao comprimento médio da radícula. Já em relação ao comprimento do hipocótilo, as diferentes concentrações do extrato aquoso e etanólico diferiram estatisticamente quando comparados com o controle, dado que não foi observado para o extrato hidroetanólico (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeitos das diferentes concentrações dos extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico de *O. spectabilis* na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface).

Tratamento	Extrato (mg/mL)	G±DP (%)	Tm±DP (horas)	Vm±DP (sementes/hs)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
Água	-	99,33±01,03a	14,91±0,79a	0,067±0,0037a	11,75±3,59a	2,88±0,44a
Aquoso	5	96,33±02,33a	20,51±1,73a	0,049±0,0040a	05,73±1,41b	2,68±0,58b
	10	93,33±04,67a	33,06±4,33b	0,030±0,0044b	04,14±1,14c	2,37±0,53c
	20	46,66±18,40b	43,12±2,21b	0,023±0,0012b	03,09±1,36d	2,39±2,08c
Hidroetanólico	5	97,33±02,73a	19,42±2,02a	0,051±0,0054a	05,47±1,68b	3,03±0,89b
	10	97,00±03,74a	22,32±1,42b	0,044±0,0027b	03,20±1,06c	2,86±0,61a
	20	77,33±09,26b	30,38±2,23c	0,033±0,0025c	02,45±0,89d	2,88±0,71a
Etanólico	5	98,66±01,63a	17,37±1,51a	0,057±0,0053a	03,32±1,38b	1,53±0,80b
	10	97,66±02,94a	22,03±1,50b	0,045±0,0031b	03,28±0,73b	2,54±0,56c
	20	90,00±03,34b	28,69±2,70b	0,035±0,0035b	02,47±0,32c	2,03±0,47d

Os dados são apresentados como a média ± Desvio padrão. Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Legenda: G%= porcentagem média de germinação, Tm= tempo médio de germinação e Vm= velocidade média de germinação.

### 3.2 Ensaio de pré-emergência e pós-emergência com as frações do extrato hidroetanólico de *O. spectabilis*.

Na tabela 2 estão os resultados do ensaio de pré-emergência para as frações do extrato hidroetanólico. Para as sementes tratadas com 5mg/mL das diferentes frações foi verificado que somente o tratamento com a fração acetato de etila apresentou redução significativa na taxa de germinação (66%), diferindo estatisticamente das outras frações e do controle (98%). Os índices de tempo médio e velocidade média de germinação exibiram padrão semelhante, apresentando-se estatisticamente diferentes do controle água somente o tratamento com a fração acetato de etila.

**Tabela 2.** Efeitos das diferentes frações (Acetato de Etila, Acetato de Etila/Metanol 70%/30%, Acetato de Etila/Metanol 50%/50%, Acetato de Etila/Metanol 30%/70% e Metanol) do extrato hidroetanólico (5mg/mL) na germinação de *Lactuca sativa* (alface).

Tratamento	G±DP (%)	Tm±DP (horas)	Vm±DP (sementes/hs)
Água	98,00±02,00a	17,37±0,76 <sup>a</sup>	0,057±0,0026 <sup>a</sup>
AE	34,00±10,58b	41,95±2,67b	0,023±0,0016b
AE/Me(70/30)	96,00±02,00a	19,66±0,34 <sup>a</sup>	0,050±0,0009 <sup>a</sup>
AE/Me(50/50)	96,00±02,00a	18,45±0,50 <sup>a</sup>	0,054±0,0015 <sup>a</sup>
AE/Me(30/70)	94,66±04,16a	18,47±0,63 <sup>a</sup>	0,054±0,0019 <sup>a</sup>
Me	99,33±01,15a	19,12±0,72 <sup>a</sup>	0,052±0,0020 <sup>a</sup>

Os dados são apresentados como a média ± Desvio padrão. Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Legenda: G%= porcentagem média de germinação, Tm= tempo médio de germinação e Vm= velocidade média de germinação.

Já para a medição do comprimento médio radicular das plântulas tratadas com 1mg/mL das diferentes frações do extrato hidroetanólico em 48 horas de exposição, foi

verificado diferença estatística quando comparadas com o controle, no entanto as mesmas não apresentaram diferença significativa entre si. Quanto ao comprimento médio do hipocótilo não foi observado diferença estatística entre as diferentes frações e entre estas e o controle água (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeitos das diferentes frações (Acetato de Etila, Acetato de Etila/Metanol 70%/30%, Acetato de Etila/Metanol 50%/50%, Acetato de Etila/Metanol 30%/70% e Metanol) do extrato hidroetanólico (1.0mg/mL) no crescimento de plântulas de *L. sativa* (alface) após 48 horas.

Tratamento	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
Água	20,30±6,76a	3,36±0,74a
AE	15,13±3,33b	3,80±1,46a
AE/Me(70/30)	15,93±3,61b	3,25±0,79a
AE/Me(50/50)	15,83±5,05b	3,79±0,78a
AE/Me(30/70)	12,29±3,33b	3,08±0,53a
Me	13,45±4,05b	3,39±0,73a

Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3 pH, potencial osmótico e condutividade elétrica dos extratos e fração

A caracterização físico-química dos diferentes extratos orgânicos e da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico de *O. spectabilis* revelou uma variação de pH, entre 3,67 e 5,09. A água utilizada nos grupos controle apresentou o pH igual a 6,06.

O potencial osmótico variou de -0,0004 a -0,0299 MPa para os diferentes extratos e fração. Os valores médios da condutividade elétrica variaram de 0,029 a 0,564mS cm<sup>-1</sup> para os diferentes extratos e fração (Tabela 4).

**Tabela 4.** pH, potencial osmótico e condutividade elétrica dos extratos orgânicos e da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico de *O. spectabilis*.

Tratamento	Extrato (mg/mL)	pH	Potential Osmótico (MPa)	Condutividade elétrica (mS/cm)
Água	-	6,06	0,0	0,004
Aquoso	5	5,09	-0,0004	0,336
	10	5,06	-0,0081	0,490
	20	5,01	-0,0284	0,550
Hidroetanólico	5	4,67	-0,0004	0,166
	10	4,58	-0,0088	0,308
	20	4,50	-0,0250	0,564
Etanólico	5	4,06	-0,0018	0,081
	10	3,83	-0,0109	0,142
	20	3,67	-0,0299	0,207
Fração Acetato de Etila	5	4,83	-0,0004	0,029

### 3.4 Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*

O índice mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os extratos (Aquoso e Hidroetanólico) de *O. spectabilis* com a concentração de 20mg/mL foi respectivamente de (06,96 e 07,08) sendo estes valores diferentes estatisticamente do controle negativo (14,52) e do controle positivo MMS (9,74), no entanto não apresentarão diferença significativa quando comparados entre si. Quando observado o extrato etanólico nesta concentração a leitura do teste não pode ser realizada, devido à necrose recorrente da raiz principal seguido do surgimento de raiz adventícia (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os extratos (Hidroetanólico e Aquoso) de *O. spectabilis* na concentração de 20mg/mL, controle negativo (CN) tratado como água e controle positivo tratado com 0,0077 µl/mL de metilmetanosulfanado (MMS).

Tratamento	Divisão celular					Índice Mitótico <sup>a</sup>
	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
CN	3387a	386a	70a	39a	86a	14,52±02,17a
Hidroetanólico	4588b	222b	46b	19b	61b	06,96±01,45c
Aquoso	4595b	217b	46b	33ba	58b	07,08±01,69c
MMS	4353b	322b	65b	23b	77b	09,74±02,50b

<sup>a</sup>Índice Mitótico = (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

Quando observado o número de prófases, metáfases, anáfase e telófase os diferentes extratos na concentração de 20mg/mL exibiram redução significativa do numero de células nestas fases quando comparadas com o controle negativo, e não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle positivo e entre si (Tabela 5).

### 3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante tornou-se progressivamente maior com o aumento das concentrações para o diferente extrato aquoso, hidroetanólico, etanólico e fração acetato de etila do extrato hidroetanólico. Sendo as maiores atividades antioxidantes observadas para as concentrações de 1000µg/mL apresentando 88,91%, 86,45%, 84,50% e 79,28% e EC50% de 282,99µg/mL, 148,24µg/mL, 145,33µg/mL, e 512,35 µg/mL respectivamente (Tabela 6).

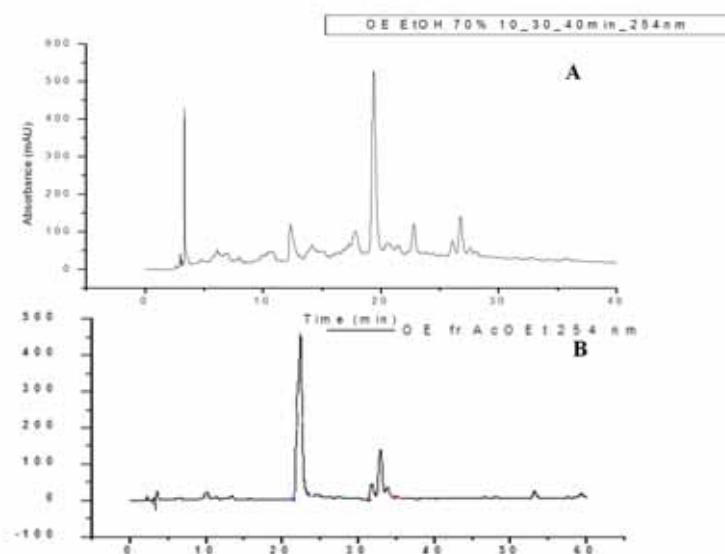
**Tabela 6.** Atividade sequestradora do radical livre (DPPH) dos extratos orgânicos e da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico de *O. spectabilis*

Concentration (µg/mL)	Extrato	Extrato	Extrato	Fração acetato
	Aquoso	Hidroetanólico	Etanólico	de etila
	% Antioxidant activity	% Antioxidant activity	% Antioxidant activity	% Antioxidant activity
25	10,04	09,70	10,56	-
50	12,13	18,73	20,89	-
75	18,20	25,50	32,15	-
100	19,66	34,53	41,31	-
250	42,88	61,62	78,63	21,33
500	85,56	84,19	84,03	48,74
1000	88,91	86,45	84,50	79,28
EC50%	282,99	148,24	145,33	512,35
Quercetina	63,72			
Ácido Gálico	43,80			

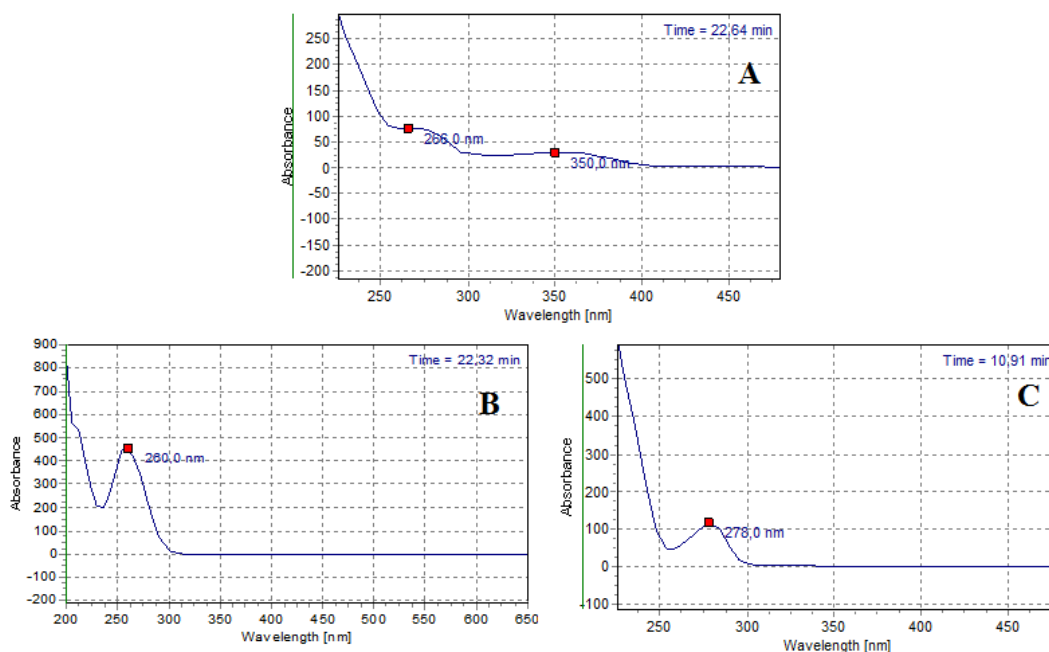
<sup>a</sup>mg de ácido gálico equivalente/g de extrato, <sup>b</sup>mg quercetina equivalente/g de extrato

### 3.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PAD)

O *screening* por HPLC-PAD do extrato hidroetanólico de *O. spectabilis* e da fração acetato de etila (Figura 1A e B), apresentaram perfil cromatográfico com metabólitos detectados quando utilizada uma coluna C18 com 250 x 4.6 mm i.d. de partículas com tamanho médio de 5µm. Com auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm, obteve-se espectros na região do UV onde pode ser verificado picos com bandas de absorção típicos de flavonoides (Figura 2A), os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel-B, apresentando maior incidência de moléculas do grupo das flavonas e flavonóis, dentre estas ainda foi destacado a presença de flavonoides glicosilados e de metabólitos possivelmente pertencentes ao grupo das isoflavonas e catequinas (Figuras 2B e C).



**Figura 1.** (A) Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico obtido por HPLC-PAD. (B) Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico obtido por HPLC-PAD. Sistema de eluição: **A** (Acetonitrila + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (Água + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 10-30% de **A** em **B** em 60 min. Coluna Phenomenex® Luna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm i.d., 5µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, λ= 254 nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.



**Figura 2.** (A) Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonoides, (B) Espectro de UV típico de uma possível isoflavona e (C) Espectro de UV típicos de uma possível catequina.

#### 4. Discussão

No cerrado as plantas estão expostas a altas temperaturas, solos nutricionalmente pobres, ácidos e com intensa competição por nutrientes, fatores estes que estimulam a produção de compostos bioativos que influenciam nas diferentes interações existentes neste ambiente (Klink e Machado, 2005; Fine et al., 2006; Haridasan, 2008). *O. spectabilis* espécie

característica do cerrado, destacou-se pelo fato de restringir o desenvolvimento de outras espécies ao redor de seu caule juntamente ao fato de que atualmente existem poucos estudos sobre as potencialidades dos compostos bioativos desta planta.

Dentro deste contexto, nos ensaios de pré-emergência foi observado para os diferentes extratos nas concentrações de 20mg/mL e para a fração acetato de etila do extrato hidroetanólico na concentração de 5mg/mL alterações significativas em todos os índices analisados para a planta alvo (Tabelas 1 e 2). Tais resultados corroboram estudos realizados por Reigosa et al. (1999), Inderjit e Callaway (2003) e Blanco, (2007) onde destacaram que o potencial que os aleloquímicos apresentam, provocando alterações em diversos processos fisiológicos, possivelmente interferindo no processo de germinação, pode estar diretamente relacionado à concentração e o tempo em que ocorreu a exposição.

Quanto aos ensaios de pós-emergência, foram observadas reduções significativas no desenvolvimento das plântulas com inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo, sendo que apenas o tratamento com o extrato hidroetanólico não apresentou inibição do crescimento do hipocótilo (Tabelas 1 e 3). Ferreira e Áquila (2000) demonstraram que os aleloquímicos podem influenciar de maneira variável no desenvolvimento de plântulas, devendo-se avaliar ainda uma possível variação dos efeitos quanto o órgão considerado. Golisz et al. (2008) observaram que alguns aleloquímicos induzem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem causar a morte das células da raiz reduzindo assim seu crescimento.

Os fatores pH, condutividade elétrica e potencial osmótico dos extratos e fração testados nesse estudo também foram avaliados, pois quando alterados podem interferir em processos celulares fundamentais, provocando alterações na capacidade de germinação e desenvolvimento de plântulas, apontando para um possível efeito fitotóxico de maneira errônea. No entanto, os diferentes extratos orgânicos e fração acetato de etila apresentaram variação de pH (3,67 a 5,09) dentro do intervalo (3,0 a 7,0) que não influenciam no processo de germinação de alface, como demonstrado por Baskin e Baskin (1998) e Carmo et al. (2007). A condutividade elétrica apresentou-se dentro do estabelecido por Souza et al. (2003), que verificou que valores abaixo de 20mS/cm não são prejudiciais para a germinação de sementes de alface. Assim como observado para o potencial osmótico, onde os intervalos de valores de -0,0004 a -0,0299 MPa dos diferentes extratos e fração não excederam -0,2MPa como relatado por Gatti et al. (2004) (Tabela 4).

Com relação ao índice mitótico, um efeito mitodepressivo foi observado para os tratamentos com o extrato aquoso e hidroetanólico, sendo que a redução observada para estes tratamentos foi maior que a observada para o controle positivo (MMS), estando relacionada



possivelmente a presença de compostos fitotóxicos. O tratamento com o extrato etanólico na concentração de 20mg/mL provocou necrose na raiz primária da plântulas expostas, sugerindo assim um efeito fitotóxico efetivo sobre o tecido da raiz (Tabela 5). Nesse sentido, sabe-se que alguns aleloquímicos possuem atividade no controle da produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo os EROs acumulados nas células em resposta aos aleloquímicos causando danos, tais como a peroxidação lipídica, alterando assim a permeabilidade de membrana e conseqüentemente levando a morte celular (Testa, 1995; Mori e Schroeder, 2004; Weir et al., 2004). Os dados obtidos neste teste foram similares aos encontrados por Silva et al. (2012) e Pawlowski et al. (2013).

Outro fator avaliado foi à atividade antioxidante dos diferentes extratos e da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico, verificando-se um aumento na atividade dependente da concentração, sendo as maiores atividades observadas na concentração de 1000µg/mL (Tabela 6). Huckelhoven e Kogel (2003) demonstraram, que diferentes aleloquímicos com potencial antioxidante não estão apenas envolvidos com os mecanismos de defesa da planta, podendo estes causar interferência no processo de germinação e desenvolvimento de plântulas.

A análise dos possíveis compostos envolvidos com o potencial fitotóxico foi realizada em HPLC-PAD tanto no extrato hidroetanólico quanto em sua fração acetato de etila (Figura 1A e 1B). A varredura foi realizada na região do UV onde pode ser verificados picos com bandas de absorção típicos de flavonoides (Figura 2A) os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximo na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel-B. A maior incidência de moléculas do grupo das flavonas foi observada, as quais são reconhecidos por apresentarem faixas espectrais com picos para a banda II em torno de 240-280 nm e picos de banda I em torno 300-380 nm de acordo com estudos realizados por Mabry et al., 1970, Merken e Beecher, 2000 e Saldanha, 2013, podendo ainda ser identificado dentro destes a presença de flavonoides glicosilados. Identificando-se também picos com comprimentos de onda típicos de isoflavonas com 260nm e catequinas 278nm (Figura 2B e 2C) (Khokhar et al., 1997; Garrett et al., 1999).

Compostos aleloquímicos entre eles os flavonoídicos são reconhecidos por possuírem a capacidade de provocar um efluxo de íons afetando a permeabilidade da membrana, provocando disfunções que conduzem à morte celular como demonstrado por Yu et al. (2003). Semelhantemente, Weir et al. (2003) demonstram o potencial de moléculas do grupo das catequinas em interferir na germinação de sementes. Assim como Perry et al. (2005) que

demonstraram a capacidade destes compostos em provocar efeitos variados em diferentes espécies de planta.

Os dados obtidos por meio do HPLC-PAD apoiam estudos anteriores como o de Felício (1995) que observou a presença de bigenkanina e metoxiflavona dois biflavonoides em extratos de *O. spectabilis*. Semelhantemente Moreira et al. (1994 e 1999) identificaram a presença de isoflavonas e uma flavona em folhas de *O. hexasperma*. Monache et al. (1967) em estudo desenvolvido com *Ouratea* sp. isolaram e identificaram uma molécula de catequina e proantocianidina.

A presença de biflavonoides e flavonoides também foi observada em outras espécies deste gênero como relatado por Carvalho et al. (2000) em extratos preparados de *O. staudtii* (van Tiegh.) Keay, por Felício et al., (2004) em *O. parviflora* (DC.) Baill, Estevam et al. (2005) em *O. floribunda* (A.St.-Hil.) Engl., Mbing et al. (2006) em *O. nigroviolacea* Gilg ex De Wild e Zintchem et al. (2007) em *O. nítida* (Sw.) Engl. Sendo assim Zintchem et al. (2007) acreditam que devido a constante presença dos biflavonoides, estes parecem ser úteis como marcadores quimiotaxonómicos para o gênero *Ouratea*.

De acordo com Cantrell et al, (2012) o crescente número de pesquisas aplicadas à atividade alelopática e a de identificação de compostos aleloquímicos em diferentes espécies, vem auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias de controle e novos modelos de herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente quando comparados aos herbicidas sintéticos amplamente utilizados. Neste sentido, os resultados do presente estudo indicaram para os diferentes ensaios que *O. spectabilis* apresenta compostos fitotóxicos capazes de interferir no processo de germinação, crescimento e desenvolvimento de outras espécies. A predominância dos compostos flavonoídicos foi indicada por meio da caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico e fração acetato de etila, podendo estes estar diretamente relacionados com a atividade biológica observada, apresentando assim potencial para ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas biológicos.

## **5. Agradecimentos**

Os autores são gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## **6. Referências**

Aires S.S., Ferreira A.G., Borghetti F., 2005. Efeito Alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. Acta Botanica Brasílica 19, 339-344.

- Alves, C.C.F., Alves, J.M., Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Neto, J., 2003. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. Revista Floresta 10, p.93-97.
- Alves, M.C.S., Filho, S.M., Innecco, R., Torres, S.B., 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, Pesquisa Agropecuária Brasileira 39, 1083-1086.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. Seeds – Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego.
- Blanco, J.A., 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forestmodels. Ecological Modelling 209, 65–77.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199–1200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier M.E., Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, Lebensm.-Wiss. u.-Technol 28, 25-30.
- Cantrell, C.L., Dayan, F.E., Duke, S.O., 2012. Natural products as sources for new pesticides. Journal of Natural Products 75, 1231–1242.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L., Takaki, M., 2007. Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer aqueous extracts. Acta Botanica Brasilica 21, 697–705.
- Carvalho, M.G., Carvalho G.J.A., Braz-Filho, R., 2000. Chemical Constituents from *Ouratea floribunda*: Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of Atranorin and its New Acetyl Derivative. Journal of the Brazilian Chemical Society 11, 143-147.
- Di Mambro, V.M., Fonseca, M.J.V., 2005. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 287–295.
- Estevam, C.S.; Oliveira, F.M.; Conserva, L.M.; Lima, L.F.C.O.; Barros, E.C.P.; Barros, A.C.P.; Rocha, E.M.M.; Andrade, E.H.A., 2005. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochnaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 15,195-198.
- Felício, J.D., Gonzalez, E., Braggio, M.M., Costantino, L., Albasini, A., Lins, A.P., 1995. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. Planta Medica 61, 217-220.
- Felício, J.D., Rossi, M.H., Braggio, M.M., Gonzalez, E., PAK, A., Cordeiro, I., Felício, R. C., 2004. Chemical constituents from *Ouratea parviflora*. Biochemical Systematics and Ecology 32, 79-81.
- Ferreira, A.G., Aqüila, M.E.A., 2000. Allelopathy: an Emerging Topic in Ecophysiology. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12, 175-204.
- Fine, P.V.A., Miller, Z.J., Mesones, I., Irazuzta, S., Appel, H.M., Stevens, M.H.H., Sääksjärvi, I., Schultz, J.C., Coley, P.D., 2006. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. Ecology 87, 150–162.
- Garrett, S. D., Lee, H. A., Friar, P.M.K., Morgan, M.R.A., 1999. Validation of a novel estrogen receptor-based microtitration plate assay for the determination of phytoestrogens in soybased foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 4106-4111.
- Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A., Lima, M.I.S., 2004. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. Acta Botanica Brasilica 18, 459–472.
- Golisz, A., Sugano, M., Fujii, Y., 2008. Microarray expression profiling of *Arabidopsis thaliana* L. in response to allelochemicals identified in buckwheat. Journal of Experimental Botany 59, 3099–3109.

- Haig, T.J., Haig, T.J., Seal, A.N., Pratley, J.E., An, M., Wu, H., 2009. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. *Journal of Chemical Ecology* 35, 1129–1136.
- Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20, 183–195.
- Huckelhoven, R., Kogel, K.H., 2003. Reactive oxygen intermediates in plant–microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891–902.
- Inderjit., Callaway, R.M., 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil* 256, 1-11.
- Inderjit., Wardle, D.A., Karban, R., Callaway, R.M., 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology and Evolution* 26, 655-662.
- Jeronimo C.A., Borghetti F., Sá C.M., 2005. Allelopathic effects of *Solanum lycocarpum* leaf extracts on protein synthesis during the growth of sesame seedlings. . In: Harper, J.D.I., An, M., Kent, J.H., Wagga Wagga, N.S.W. (Eds), Australia. International Allelopathy Society, pp.473-476.
- Jinhu, M., Guofang, X., Wenxiu, Y., Leilei, M., Mei, G., Yuguo, W., Yuanhuai, H., 2012. Inhibitory effects of leachate from *Eupatorium adenophorum* on germination and growth of *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium glaucum*. *Acta Ecologica Sinica* 32, 50–56.
- Khokhar, S., Venema, D., Hollman, P.C.H., Dekker, M., Jongen, W., 1997. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Letters* 114, 171-172.
- Klink, C.C., Machado, R.B., 2005. Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology* 19, 707–713.
- Labouriau, L.F.G., 1983. A germinação das sementes. Washington: Departamento de Assuntos Científicos e Tecnológicos da Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. Série Biologia, monografia, n. 24, p.174.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research* 682, 71–81
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York
- Mbing ,J.N., Gueiffier, C.E., Atchadé, A.T., Allouchi, H., Piéboji, J.G., Mbafor, J.T., Tih, R.G., Pothier, J., Pegnyemb, D.E., Gueiffier, A., 2006. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. *Phytochemistry* 67, 2666–2670.
- Merken, H.M. and Beecher, G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28, 3, 577-599.
- Miró, C.P., Ferreira, A.G., Áquila, M.E.A., 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33, 1261-1270.
- Monache, F.D., Albuquerque, I.L., Eerrari, F., Bettólo, G.B.M., 1967. A new catechin and adimeric proanthocyanidin from OURATEA SP. *Tetrahedron Lettere* No.439 pp. 4211-4214, 1967. *Tetrahedron Lettere* 439, 4211-4214.
- Moreira, I.C., Sobrinho, D.C., De Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., 1994. Isoflavone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry* 35, 1567–1572.
- Moreira, I.C., Carvalhoa, M.G., Bastosa, A.B.F.O., Braz-Filho, R., 1999. A favone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry* 51 833-838.
- Mori, I.C., Schroeder, J.I., 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* 135, 702–708.

Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasil, M.C., Caramão, E.B., Zini, C.A., Soares, G.L.G., 2013. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. South African Journal of Botany 88: 198–203.

Paulo, M.Q., Lima, E. O., Maia, R.F., Xavier Filho, L., Atividade antimicrobiana do óleo dos frutos de *Ouratea parviflora* Baill (Ocnaceae), CCS, João Pessoa, 8 (1986) pp.1921.

Pereira, R.S., Santana, D.G. and Ranal, M.A. 2009. Seedling emergence from newly-collected and storage seeds of *Copaifera langsdorffii* Desf. (caesalpinoideae), triângulo mineiro, Brazil. Revista Árvore 33, 643-652.

Perry, L.G., Johnson, C., Alford, E.R., Vivanco, J.M., Paschke, M.W., 2005. Screening of grassland plants for restoration after spotted knapweed invasion. Restoration Ecology 13, 725–735.

Procópio, S.O., Santos, J.B., Silva, A.A., Pires, F.R., Ribeiro, J.I.J., Santos, E.A., 2005. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-Sodium. Plantas Daninhas 23, 9-16.

Rao, K.V., Sreeramulu, K., Venkata Rao, C., Gunasekar, D., Martin, M.T., Bodo, B., 1997. Two New Biflavonoids from *Ochna obtusata*. Journal of Natural Products 60, 632–634.

Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A., Gonzáles, L., 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. Critical Reviews in Plant Sciences 18, 577–608.

Rice, E.L. Allelopathy. Orlando: Academic Press, p.422, 1984.

Rizvi, S.G.H., Rizvi, V. (Eds.) Allelopathy: basic and applied aspects. London: Chapman and Hall, p.480, 1992.

Saldanha, L.L. 2013. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Tese (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 161.

Santana, D.G., Ranal, M.A., 2004. *Analysis of Germination: A Statistical Approach* UNB, Brasília. 247 pp.

Silva, F.M., Aqüila, M.E.A., 2006. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas, Revista Árvore 30, 547-555.

Silva, R.M.G., Livio, A.A., Santos, V.H.M., Mecina, G.F., Silva, L.P. 2012. Allelopathy and phytotoxicity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Allelopathy Journal 30, 221-234.

Soares, G.L.G., Vieira, T.R., 2000. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. “Grand Rapids”) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae, Floresta e Ambiente 7, 180-197.

Souza, L.S., Velini, E.D., Maiomoni-Rodella, R.C.S., 2003. Allelopathic effect of weeds and concentrations of *Brachiaria decumbens* on the initial development of eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). Planta Daninha 21, 343–354.

Souza, V.C., Lorenzi, H., 2008. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG 2ª ed., Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo.

Suzart, L.R., Daniel, J.F.S., De Carvalho, M.G., 2007. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (OCHNACEAE). Química Nova 30, 984-987.

Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. Ecotoxicology and Environmental Safety 84, 125–132.

Testa B: The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. New York: Academic Press; 1995:475.

Villela, F.A., Doni Filho, L., Sequeira, E.L., 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. Pesquisa Agropecuária Brasileira 26, 1957-1968.

Weir, T.L., Bais, H.P., Vivanco, J.M., 2003. Intraspecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (S)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). *Journal of Chemical Ecology* 29, 2397-2412.

Weir, T.L., Park, S.W., Vivanco, J.V., 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 472-479.

Yu, J.Q., Ye S.F., Zhang, M.F., Hu, W.H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* 31,129-139.

Zintchem, A.A., Atchadé, A.T., Tih, R.G., Mbafor, J.T., Blond, A., Pegnyemb, D. E., Bodo, B., 2007. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 255-256.

### Capítulo 3

Genotoxicidade de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae) e *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. (Ochnaceae) utilizando o teste do *Allium cepa*.

Gustavo F. Mecina<sup>(1)</sup>, Michelly C. Montenoti<sup>(1)</sup>, Luciana P. Silva<sup>(1)</sup>, Regildo M. G. Silva<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

\* Autor para correspondencia. Tel.: +5518; fax: +5518

e-mail: mecina\_16@hotmail.com

**Resumo:** A utilização de plantas medicinais para tratamentos alternativos faz parte da cultura humana, principalmente por sua acessibilidade e disponibilidade, destacando a biodiversidade como fonte de biomoléculas com grande potencial biotecnológico. No entanto, juntamente com o aumento do consumo de plantas medicinais em tratamentos alternativos e a busca por novos compostos com atividade biológica, surgiu a necessidade de se investigar as potencialidades tóxicas, cancerígenas e teratogênicas destes compostos. Pois alguns compostos presentes em plantas medicinais apresentaram - se potencialmente tóxicos, cancerígenos e teratogênicos. Entre muitas espécies, *Tridax procumbens* e *Ouratea spectabilis* destacam-se por serem plantas comumente utilizadas na medicina popular, encontrando relatos variados da utilização das mesmas. Neste contexto este estudo foi realizado para investigar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquosos dessas espécies sobre as células da raiz de *Allium cepa*. Foi possível observar que os diferentes extratos das duas espécies provocaram uma redução no índice mitótico quando os mesmos foram comparados com o controle negativo. Apresentando ainda alterações para os tratamentos com *T. procumbens* nos índices de morte e de mutagenicidade e para *O. spectabilis* nos índice de morte, alterações cromossômicas e de mutagenicidade. Neste contexto os resultados encontrados sugerem que os extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* possuem efeito inibitório da mitose e mutagênicos sobre a divisão celular de células meristemáticas de raiz de *A. cepa*.

Palavras Chave: *Allium cepa*; citotóxicos; genotóxicos; índice mitótico



## Introdução

A biodiversidade tem sido fonte de biomoléculas com grande potencial de utilização biotecnológica, sendo, entre outras, uma importante fonte para indústria farmacêutica e agrônômica (Elumalai et al., 2011). Tratamentos alternativos principalmente com plantas medicinais faz parte da cultura humana e em muitos países são de uso habitual, principalmente por sua acessibilidade e disponibilidade (Who, 2002). Entre muitas espécies, *Tridax procumbens* L. e *Ouratea spectabilis* (MART. EX ENGL) ENGL. destacam-se por serem plantas comumente utilizadas na medicina popular, encontrando relatos da atividade de *T. procumbens* como anticoagulante, antifúngica, repelente de insetos, espectorante, anti-diarréica, antidesentérica, na prevenção da queda de cabelo e com atividade de cicatrização (Saraf et al., 1991; Taddei e Rosas-Romero, 2000). Estudos vêm demonstrando algumas propriedades de *T. procumbens* como anti-inflamatória, hepatoprotetora, na cicatrização, imunomoduladora, antimicrobiana, como anti-séptico e hipotensor (Ravikumar et al., 2005.; Jachak et al., 2011; Christudas et al., 2012), sendo que alguns trabalhos de caracterização fitoquímica já relataram a presença de flavonoides, luteolina, dexametasona, glucotureolina,  $\beta$ -sitosterol, flavona, glicosídeos e quercetina (Subramaniam et al., 1968; Saxena e Albert, 2005; Mundada e Shivhare, 2010).

Quando analisada a literatura, foram encontrados relatos populares da utilização de *O. spectabilis* para tratar distúrbios gástricos e reumáticos (Paulo et al., 1986). Um estudo fitoquímico realizado por Felício (1995) revelou a presença de dois biflavonoides, bigenkanina e metoxiflavona, evidenciando o potencial desta espécie para produção de metabolitos secundários.

Na busca por novos compostos bioativos, surgiu a necessidade cada vez maior de se investigar as potencialidades tóxicas, cancerígenas e teratogênicas destes compostos (Akinboro e Bakare, 2007). Pois mesmo diante dos muitos benefícios terapêuticos, alguns compostos presentes em plantas medicinais apresentaram-se potencialmente tóxicos, cancerígenos e teratogênicos (Gadano et al., 2006; Mulaudzi et al., 2013, Timothy., 2014).

No entanto, há poucos relatos sobre as propriedades toxicológicas e mutagênicas dessas plantas na literatura, e o ensaio biológico com *Allium cepa* é um teste sensível que vem sendo amplamente empregado para a determinação de agentes antimitóticos, citotóxicos e genotóxicos de várias substâncias químicas provenientes de plantas (Olorunfemi et al., 2011; Herrero1 et al., 2012). Neste contexto este estudo foi realizado para investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquosos dessas plantas sobre as células de *Allium cepa*.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal e preparação dos extratos**

As partes vegetais (folhas de *Ouratea spectabilis* e partes aéreas de *Tridax procumbens*) foram coletadas de espécimes presente na Universidade Estadual Paulista Assis – SP (22°39'42''S e 50°24'44''W, Altitude: 546m). O voucher da espécie *O. spectabilis* está depositado no herbário do Instituto Florestal de São Paulo (SPSF) subnúmero 70323 e o da espécie *T. procumbens* está depositado na coleção científica do laboratório de Sistemática Vegetal, FCL, UNESP – Assis (HASSI) subnúmero 113. A coleta foi realizada de forma sustentável e sem causar impacto ambiental para a espécie *Ouratea spectabilis*. Para preparação dos extratos, as partes vegetais foram lavadas, secas em estufa (40°C) e pulverizadas. O extrato aquoso foi obtido por agitação mecânica, em água destilada [proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas a 24°C]. Logo após foi filtrado a vácuo, congelado e liofilizado para obtenção do extrato seco. O extrato hidroetanólico foi obtido por agitação mecânica em uma solução de etanol:água (70:30) na proporção de 1:10 (p:v) por 24 horas, o processo foi repetido por 3 vezes com mesmo material vegetal. Logo após, o extrato obtido foi filtrado e levado ao evaporador rotativo a 60°C para retirada do etanol e posteriormente congelado e liofilizado para obtenção do extrato seco. Semelhantemente foi obtido o extrato etanólico substituindo a solução etanol:água (70:30) por etanol absoluto, sendo que o extrato seco foi obtido após concentração em evaporador rotativo seguido de câmara de dessecação a temperatura ambiente.

### **Determinação da fitotoxicidade em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa***

Para verificação da atividade fitotóxica dos diferentes extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* sobre células de raiz de *Allium cepa* (cebola), sementes de cebola foram previamente germinadas em placas de *Petri*. Quando as raízes das plântulas atingiram 1cm em média de comprimento as mesmas foram expostas aos diferentes extratos na concentração de 20mg/ml, por um período de 48 horas, após este período foram recolocadas em placa de *Petri* contendo água destilada até atingirem 5cm médio de comprimento (período de recuperação). Todo o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e em condições de estufas de germinação tipo BOD. Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto e ácido acético glacial, 3:1). Para montagem e análise das raízes, as mesmas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C, durante 8 minutos, e posteriormente foram coradas em Reativo de Schiff por 2 horas ao abrigo da luz. As raízes foram colocadas sobre lâminas e adicionado uma gota de Carmin acético 2% sendo

cobertas por lamínulas, esmagadas e fixadas. As análises foram realizadas em microscópio óptico (100x).

Foram observadas 5000 células/ tratamento. Os efeitos citotóxicos dos extratos foram determinados pela análise do índice mitótico ( $n^\circ$  total de células em divisão/ $n^\circ$  total de células analisadas x 100) e índice de morte celular ( $n^\circ$  total de células em morte/ $n^\circ$  total de células analisadas x 100). As aberrações cromossômicas também foram determinadas (anáfase e telófase aberrantes), e suas frequências utilizadas para determinar o índice de alterações cromossômicas ( $n^\circ$  total de células alteradas/ $n^\circ$  total de células analisadas x 100). Já a determinação da frequência de células micronucleadas foi utilizada para determinar os efeitos mutagênicos, por meio da análise do índice de mutagenicidade ( $n^\circ$  de células com micronúcleo e quebras/ $n^\circ$  total de células analisadas x 100). Para o análise estatística do ensaio de *A. cepa* os resultados foram submetidos aos testes não paramétricos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (nível de significância da análise de 5% e 1%) de acordo com Leme e Marin-Morales (2009).

### **Cromatografia em camada delgada**

Foram realizadas cromatografias em camada delgada comparativa (CCDc) para identificação dos compostos presentes nos diferentes extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis*. Na análise por CCD, realizada pela otimização de metodologias descritas por Wagner et al., 1984, foram preparadas amostras de 100mg/mL dos extratos brutos diluídos em metanol, a partir dos quais foram aplicadas com capilares 20 $\mu$ l das amostras em cromatoplas de sílica gel em alumínio F250 (10 cm x 10 cm- MERCK).

Como fase móvel para detecção dos compostos flavonoídicos foi utilizado o sistema eluente clorofórmio-metanol-água (75:23:2) e como padrões quercetina, rutina e ácido gálico. A revelação das placas foi realizada por nebulização com o revelador NP/PEG. Para a detecção dos compostos do grupo dos terpenoides foi utilizado o sistema eluente tolueno-acetato de etila (93:7) e como padrões, citronellal, óleo essencial de eucalipto e óleo essencial de alecrim. As placas foram reveladas com o auxílio de um nebulizador com o revelador vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado. O último grupo analisado foi o dos alcaloides empregado o sistema eluente acetato de etila – metanol - água (100:13,5:10) e como padrões emeína, pilocarpina e solasidína. A revelação das placas foi realizada por meio de nebulização com o reagente dragendorff em sistema fechado. Sendo que as diferentes cromatografias foram analisadas na luz ultravioleta (254 e 366 nm), e após a

definição das zonas cromatográficas, foram calculados seus respectivos fatores de referência (Rf) utilizando a seguinte fórmula:  $Rf = Z_{cm}/FRONT$  cm.

## **Resultados**

### **Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa***

O índice mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* expostas aos diferentes extratos (aquoso, hidroetanólico e etanólico) de *T. procumbens* e *O. spectabilis* estão apresentados na Tabela 1. Para os tratamentos com os diferentes extratos (aquoso, hidroetanólico e etanólico) de *T. procumbens* com a concentração de 20mg/mL foi verificado índice mitótico de 10,84; 08,90 e 11,30 respectivamente, sendo que os três extratos não diferiram estatisticamente entre si e do controle positivo MMS com IM=9,74 e apenas o hidroetanólico apresentou diferença significativa quando comparado com o controle negativo (IM= 14,52).

Quanto ao número de prófases a maior redução foi observada para o tratamento com o extrato aquoso, já para metáfase, anáfase e telófase apenas o extrato hidroetanólico exibiu redução significativa do número de células nestas fases quando comparadas com o controle negativo, assim como não apresentou diferença significativa quando comparadas com o controle positivo (Tabela 1).

Para *O. spectabilis* os tratamentos com os extratos hidroetanólico e aquoso com a concentração de 20mg/mL apresentaram índice mitótico das raízes de *A. cepa* respectivamente de 07,08 e 06,96 sendo estes valores diferentes estatisticamente do controle negativo (14,52) e do controle positivo MMS (9,74), no entanto não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Tabela 1). Contudo, para o extrato etanólico na mesma concentração não pode ser realizada a leitura dos testes devido à necrose recorrente da raiz principal seguido do surgimento de raiz secundárias.

Quando observado o número de prófases, metáfases, anáfase e telófase os diferentes extratos na concentração de 20mg/mL exibiram redução significativa do número de células nestas fases quando comparadas com o controle negativo não apresentando diferença significativa quando comparadas com o controle positivo e entre si (Tabela 1).

**Table 1** - Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os extratos (etanólico, hidroetanólico e Aquoso) de *T. procumbens* e *O. spectabilis* na concentração de 20mg/mL, controle negativo (CN) tratado como água e controle positivo tratado com 0,0077µl/mL de metilmetanosulfanado (MMS).

Espécies	Diferentes extratos	Divisão celular					Índice Mitótico <sup>a</sup>
		Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
	CN	3387a	386a	70a	39a	86a	14,52±02,17a
<i>T. procumbens</i>	Etanólico	4394b	305b	96a	52a	112a	11,30±02,63ab
	Hidroetanólico	4473b	274b	64b	25b	82b	08,90±00,79b
	Aquoso	4383b	290b	104a	46a	102a	10,84±01,86ab
<i>O. spectabilis</i>	Hidroetanólico	4588b	222b	46b	19b	61b	06,96±01,45c
	Aquoso	4595b	217b	46b	33ba	58b	07,08±01,69c
	MMS	4353b	322b	65b	23b	77b	09,74±02,50b

<sup>a</sup>Índice Mitótico = (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

Na análise das alterações cromossômicas dos tratamentos com 20mg/mL dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso de *T. procumbens* foi observado a presença de célula binucleada na metáfase, com bud na interfase, com núcleo lobulado e células em metáfase, anáfase e telófase que apresentaram-se de forma aberrante (Tabela 2). O índice de alterações cromossômicas foi calculado mediante a ocorrência desses tipos celulares, não apresentando diferença estatística quando comparado com o controle negativo e entre os tratamentos, apresentando incidência menor dessas células nos diferentes tratamentos quando comparado com o controle positivo. Já para o índice de mutagenicidade, os diferentes tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo, no entanto, quando comparado com o controle positivo, apenas o tratamento com o extrato hidroetanólico não apresentou diferença estatística, sendo que os outros dois tratamentos apresentaram índices menores que o apresentado pelo controle positivo (Tabela 3). De maneira semelhante, o índice de morte foi calculado baseado no número total de células que apresentaram as alterações citadas anteriormente. Os tratamentos apresentaram um acréscimo nesse índice, no entanto apenas o hidroetanólico e o aquoso diferiram do controle negativo, mas apresentaram-se menor do que o observado para o controle positivo (Tabela 3).

Para *O. spectabilis* foram realizadas análises dos tratamentos com 20mg/mL dos extratos hidroetanólico e aquoso, pois para o extrato etanólico nesta mesma concentração não pode ser realizada a leitura como citado anteriormente. Assim foi observado para o índice de alterações cromossômicas que ambos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo, mas apresentaram menor incidência dessas alterações que o controle positivo. No entanto para o índice de mutagenicidade e índice de morte apenas o tratamento com o extrato

hidroetanólico apresentou diferença quando comparado com o controle negativo, sendo que o mesmo apresentou índices menores que o observado para o controle positivo (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2** – Aberrações cromossômicas e Micronúcleos de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os diferentes extratos (Etanólico, Hidroetanólico e Aquoso) de *T. procumbens* e *O. spectabilis* com a concentração de 20mg/mL. Controle negativo (CN) tratado com água e controle positivo tratado com 0,0077µl/mL de metilmetanosulfonato (MMS).

Espécies	Diferentes extratos	Micronúcleo	Metáfase Aberrante	Anáfase Aberrante	Telófase Aberrante	Núcleo lobulado	Quebra Cromossômica	Perda Cromossômica	Índice de Morte
	CN	0,75±0,95a	2,0±2,16a	4,2±4,03a	0,2±0,50a	0,2±0,50a	0,5±0,57a	0,0±0,00a	0,80±0,58a
<i>T. procumbens</i>	Etanólico	0,8±1,30a	0,8±0,83a	3,04±3,09b	0,4±0,54a	0,2±0,44a	2,0±2,34ab	0,6±0,89ab	0,82±0,23a
	Hidroetanólico	3,0±1,87bc	4,6±2,50b	3,20±1,09b	1,04±2,07a	0,4±0,89a	3,0±2,34b	0,8±1,09ab	1,64±0,50c
	Aquoso	2,2±1,30c	3,2±2,94ab	5,8±2,28a	1,2±0,44a	0,0±0,00a	2,6±2,50b	0,0±0,00a	1,50±0,62c
<i>O. spectabilis</i>	Hidroetanólico	01,8±1,30c	5,0±3,31d	4,2±0,44ab	0,8±0,83b	0,2±0,44a	0,8±0,83a	0,0±0,00a	1,28±0,30c
	Aquoso	01,0±1,22a	3,6±2,07c	4,6±2,96ab	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,4±0,89a	0,2±0,44a	1,02±0,36a
	MMS	05,4±2,40b	7,4±6,30b	6,6±5,59b	1,0±1,24b	4,2±3,63b	5,6±5,31b	1,2±1,30b	3,20±01,17b

5000 células analisadas. Médias ± Desvio padrão. Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Índice Mitótico, Índice de Morte, Índice de alterações cromossômicas e Índice de mutagenicidade de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com os diferentes extratos (Etanólico, Hidroetanólico e Aquoso) de *T. procumbens* e *O. spectabilis* com a concentração de 20mg/mL.

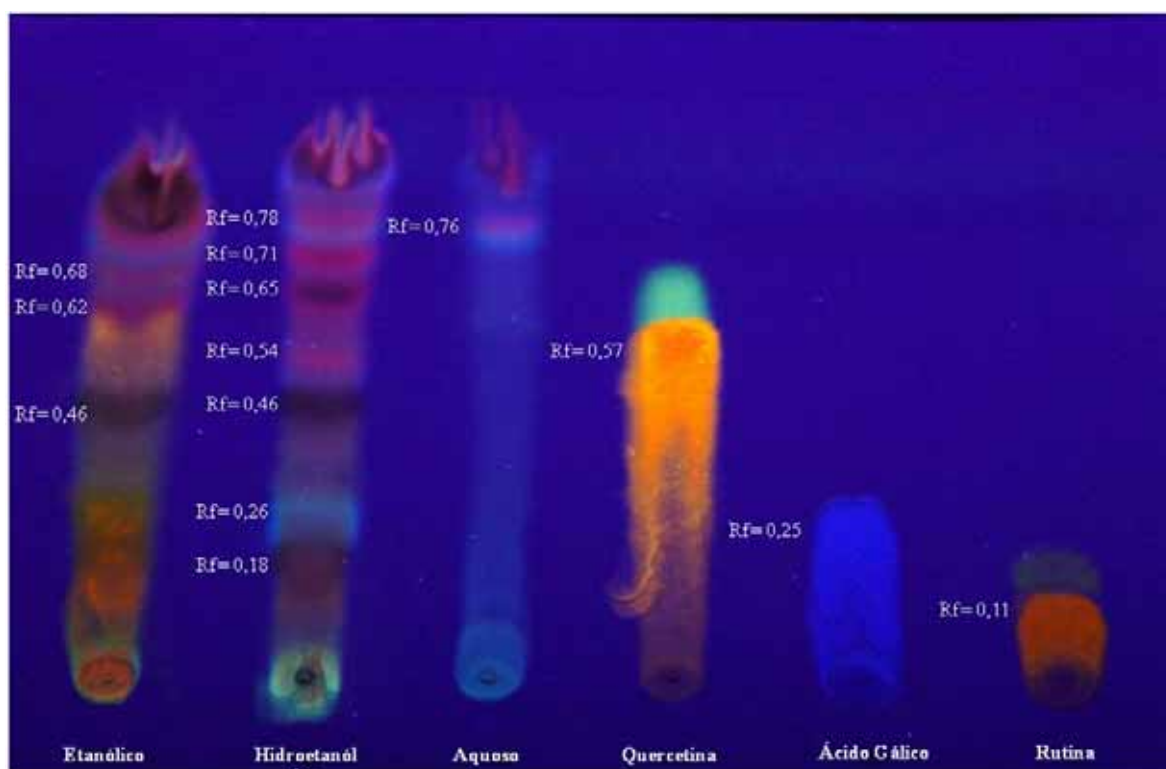
Espécies	Diferentes extratos (20mg/mL)	Índice Mitótico	Índice de Morte	Índice de alterações cromossômicas	Índice de mutagenicidade
	CN	14,52±02,17a	0,80±00,58a	0,67±00,45a	0,12±00,15a
<i>T. procumbens</i>	Etanólico	11,30±02,63ab	0,82±00,23a	0,48±00,31a	0,34±00,27b
	Hidroetanólico	08,90±00,79b	1,64±00,50b	0,96±00,42a	0,68±00,23c
	Aquoso	10,84±01,86ab	1,50±00,62b	1,02±00,35a	0,48±00,32b
<i>O. spectabilis</i>	Hidroetanólico	06,96±01,45c	1,28±00,30c	1,02±00,30c	0,26±00,19c
	Aquoso	07,08±01,69c	1,02±00,36a	0,86±00,37c	0,16±00,11a
	MMS	09,74±02,50b	3,20±01,17c	1,98±00,59b	1,22±00,77c

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

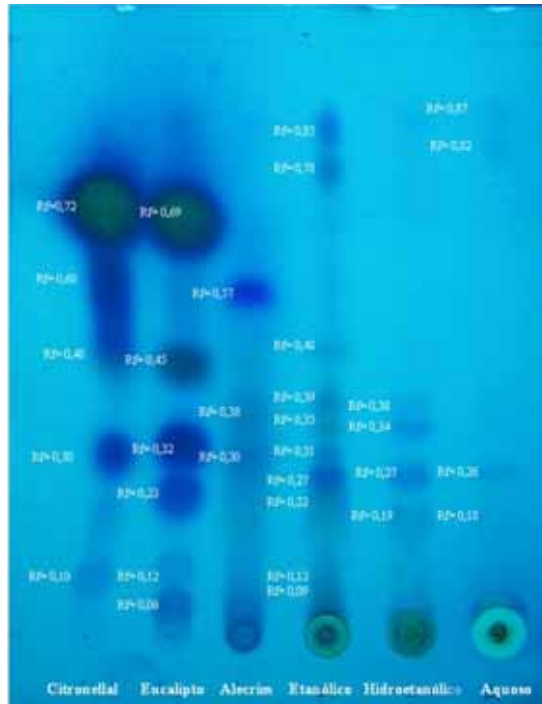
### Perfil cromatográfico

Os diferentes extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* (aquoso, hidroetanólico e etanólico) foram preparados de acordo com metodologia descrita anteriormente, e realizadas as cromatografias em camada delgada para a detecção de compostos flavonoídicos, terpênicos e alcaloídicos, sendo a revelação das placas realizadas por nebulização com os reveladores (NP/PEG), vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C e reagente dragendorff respectivamente e analisadas na luz ultravioleta (254 e 366 nm), estando identificado cada extrato e padrão nas placas cromatográficas onde foram aplicadas as amostras com seus respectivos valores de Rf como representados nas figuras 1, 2 e 3. A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença de compostos polifenólicos nos diferentes extratos brutos de *T. procumbens* apresentando os Rfs (aquoso=0,76; hidroetanólico=0,78, 0,71, 0,65, 0,54, 0,46, 0,26 e 0,18; etanólico=0,68, 0,62 e 0,46) onde

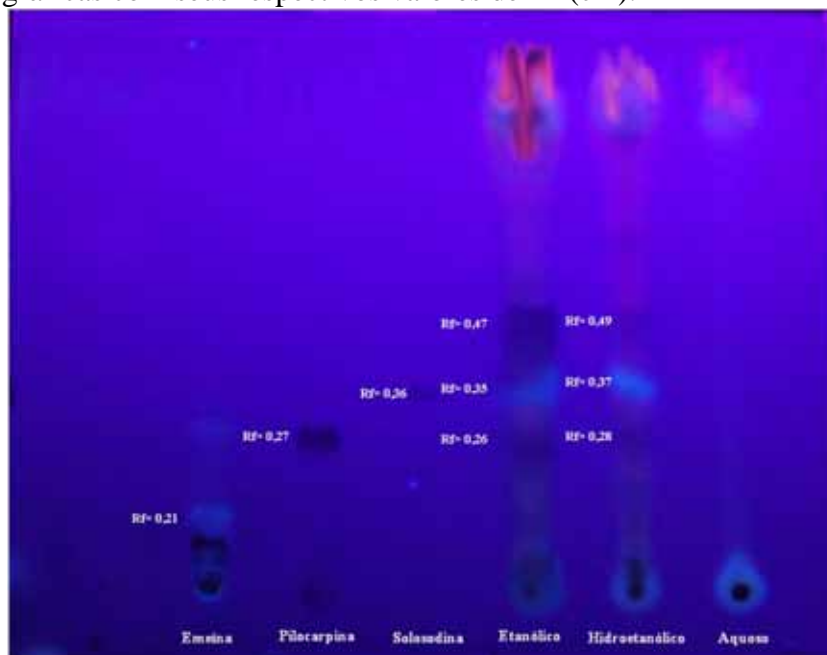
alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões quercetina, ácido gálico e rutina (Rfs=0,57, 0,25 e 0,11), indicando maior incidência no extrato hidroetanólico. Da mesma forma como para os compostos terpênicos que apresentaram os Rfs (aquoso=0,87, 0,82, 0,26, 0,18; hidroetanólico=0,38, 0,34, 0,27, 0,19; etanólico=0,85, 0,78, 0,48, 0,39, 0,35, 0,31, 0,27, 0,22, 0,12, 0,09) onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões citronellal (Rfs=0,72, 0,60, 0,48, 0,30, 0,10), citronellal, cineol, felandreno e piperitona presente no óleo essencial de eucalipto (Rfs=0,69, 0,45, 0,32, 0,23, 0,06, 0,12) e cineol, linalool, terpineol e geraniol compostos presentes no óleo essencial de alecrim (Rfs=0,57, 0,38, 0,30); entretanto, maior prevalência foi indicada no extrato etanólico. Já para os compostos alcaloídicos foi evidenciada a presença para os extratos etanólico (Rfs=0,47, 0,35, 0,26) e hidroetanólico (Rfs=0,49, 0,37, 0,28) com valores semelhantes aos encontrados para os padrões solasidina com Rf=0,36, pilocarpina Rf=0,27, emeína Rf=0,21.



**Figura 1.** Cromatograma dos diferentes extratos de *T. procumbens* e padrões Quercetina, Ácido Gálico e Rutina em sistema eluente Clorofórmio-metanol-água (75:23:2): com revelação em presença (NP/PEG). Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).



**Figura 2.** Cromatograma dos diferentes extratos de *T. procumbens* e padrões Citronellal, Eucalipto e Alecrim em sistema eluente Tolueno-Acetato de etila (93:7): Com o revelador vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

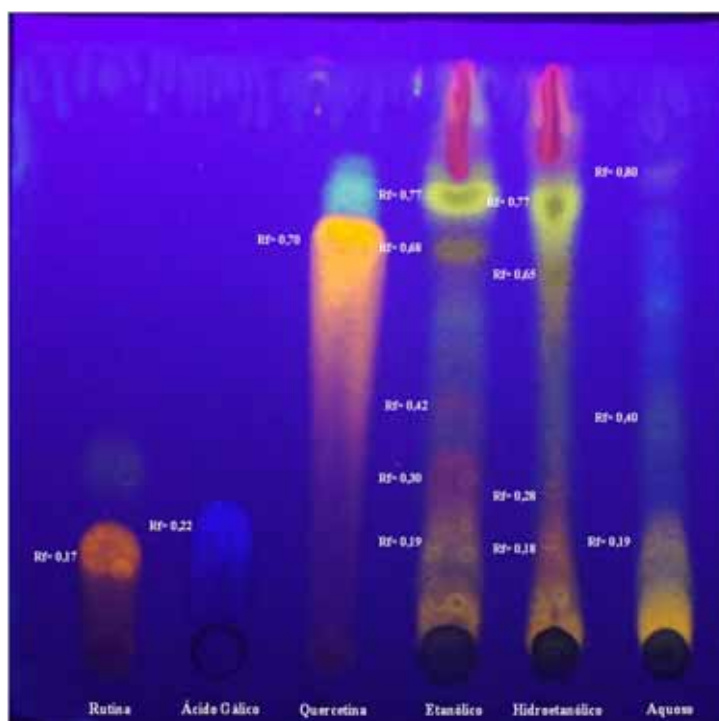


**Figura 3.** Cromatograma dos diferentes extratos de *T. procumbens* e padrões Emeína, Pilocarpina e Solasodina em sistema eluente acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10): Como revelador foi utilizado o reagente dragendorff. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

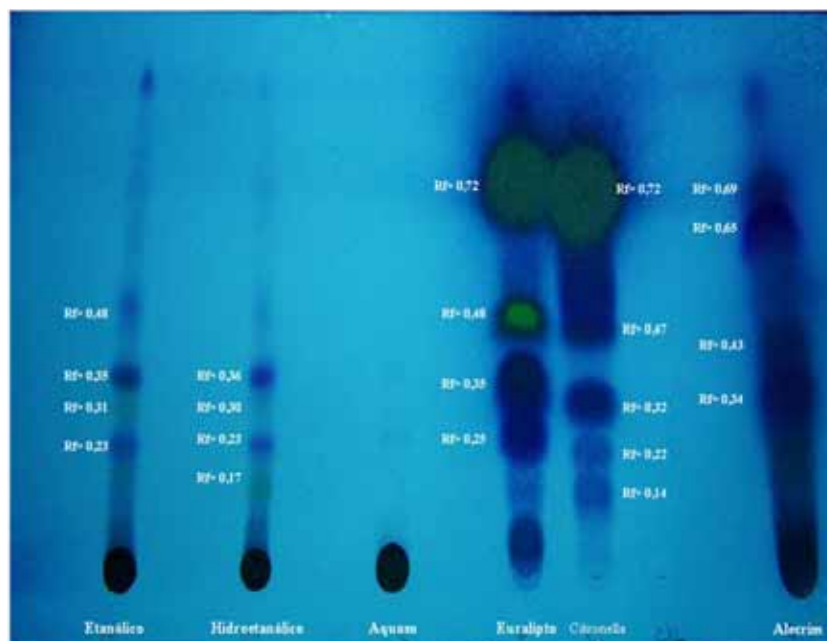
Já para *O. spectabilis* a eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram também a presença de compostos polifenólicos nos diferentes extratos brutos apresentando os Rfs: etanólico=0,64, 0,56, 0,33, 0,20, 0,13; hidroetanólico=0,65, 0,56, 0,33,



0,20, 0,14 e aquoso=0,62, 0,33, 0,13, onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões quercetina, ácido gálico e rutina (Rfs=0,56, 0,21 e 0,12) (Figura 4), assim como apresentado na Figura 5 para os compostos terpênicos onde foi observado claramente manchas nas placas dos extratos etanólico e hidroetanólico com Rfs: etanólico=0,48, 0,23, 0,31, 0,35; hidroetanólico=0,36, 0,30, 0,23, 0,17, onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões citronellal (Rfs=0,72, 0,47, 0,32, 0,22, 0,14), citronellal, cineol, felandreno e piperitona presente no óleo essencial de eucalipto (Rfs=0,72, 0,48, 0,35, 0,25) e cineol, linalool, terpineol e geraniol compostos presentes no óleo essencial de alecrim (Rfs=0,69, 0,65, 0,43, 0,34).



**Figura 4.** Cromatograma dos diferentes extratos de *O.spectabilis* e padrões Quercetina, Ácido Gálico e Rutina em sistema eluente Clorofórmio-metanol-água (75:23:2): com revelação em presença (NP/PEG). Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).



**Figura 5.** Cromatograma dos diferentes extratos de *O. spectabilis* e padrões Citronella, Eucalipto e Alecrim em sistema eluente Tolueno-Acetato de etila (93:7): Com o revelador vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

## Discussão

Na última década o número de trabalhos científicos sobre *T. procumbens* vem aumentando significativamente, tanto para sua utilização farmacológica (Christudas et al., 2012; Algariri et al., 2013; Policegoudra et al., 2014) quanto à sua ação biológica no meio ambiente, pois se trata de uma espécie invasora de alta disseminação (Kissmann e Groth, 1992). Entretanto seu perfil toxicológico e mutagênico ainda se encontra incipiente e até mesmo inexistente dentre estes estudos. Por outro lado, a espécie *O. spectabilis* ainda é pobre de informações científicas sobre sua real potencialidade farmacológica e biológica; porém, sua utilização na medicina popular e folclórica vem crescendo nos últimos anos; sendo assim, torna-se premente sua avaliação genotóxica. Diante disso estudos da potencialidade genotóxica têm sido realizados com o intuito de avaliar os riscos da ingestão de diferentes plantas com finalidade medicinal (Verschaeve e Van Staden, 2008; Akintonwa et al, 2009 Christudas et al., 2012).

Entre os testes de avaliação da potencialidade genotóxica destaca-se o do *Allium cepa*, pois o mesmo pode ser utilizado para determinar efeitos citotóxicos e genotóxicos dos mais variados tipo de substâncias químicas, sendo reconhecido por sua sensibilidade e capacidade de interagir com os agentes mutagênicos durante o seu ciclo celular (Fiskesjö, 1997; Caritá e Marin-Morales, 2008).

Estudos vêm demonstrando que a inibição do crescimento da raiz de *A. cepa* está provavelmente relacionada com redução do índice mitótico (Akinboro e Bakare, 2007; Silva et al., 2012). De maneira semelhante, a redução no número de células em divisão foi verificada nos tratamentos realizados com os diferentes extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis*, indicando efeito inibitório da mitose de células de raiz de *A. cepa*, juntamente com a maior incidência de células aberrantes (Tabelas 1 e 2), como demonstrado nos trabalhos realizados por Kwankua et al. (2010) e Timothy et al. (2014). Em conformidade com a redução do índice mitótico e aumento da frequência de células aberrantes, foram encontradas alterações para os tratamentos com *T. procumbens* nos índices de morte e de mutagenicidade e para *O. spectabilis* nos índices de morte, alterações cromossômicas e de mutagenicidade (Tabela 3).

Knoll et al. (2006), evidenciou o potencial genotóxico de *Pterocaulon polystachyum*, por meio do teste de *A. cepa*, detectando a capacidade deste de inibição da divisão celular com o aumento da concentração dos extratos aquosos (chás). Da mesma forma como apresentado no estudo desenvolvido por Pinho et al. (2010) para carqueja (*Baccharis trimera*) evidenciando efeito mutagênico do chá em células vegetais de *A. cepa* e em células humanas cultivadas.

A atividade genotóxica e mutagênica observada nos ensaios biológicos com *A. cepa* pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos observados na investigação cromatográfica, pois é conhecido o potencial fitotóxico de muitas quinonas e fenóis podendo afetar a permeabilidade da membrana, provocar danos ao DNA e proteínas e provocar a peroxidação lipídica, conduzindo à morte celular (Appel, 1993; Yu et al., 2003). Estas atividades são relacionadas à formação de radicais que doam elétrons para o oxigênio molecular, formando o radical superóxido ( $O_2^-$ ) que ainda podem sofrer uma série de reações tornando se mais reativo hidroxila ( $OH^-$ ) ou até formar o radical hidroperóxil ( $HO_2^-$ ) (Testa, 1995; Hammondkosak e Jones, 1996).

Muitas células foram retidas no estágio de interfase levando à redução das taxas de divisão celular. Analisando as subfases de interfase, relatos mostram que a fase de síntese do DNA (S) e gap 2 (G2), são as comumente alteradas por substâncias químicas, capazes de estimular a produção de radicais livres que podem provocar danos no DNA e na síntese de proteínas (Salehzadeh et al., 2003). De acordo com Rahman et al. (2013), as alterações destas subfases pode ocorrer devido ao aumento de duração e ou inibição das mesmas ocasionados por um acúmulo de danos biológicos possivelmente causados por alterações em proteínas específicas que controlam a transição do ciclos celulares (Kumar et al., 2006).

Os diferentes extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* exibiram nas CCD sob luz UV após a revelação, manchas fluorescentes de coloração amarelo-alaranjado, sugerindo a presença de flavonóis derivados de quercetina e miricetina e seus glicosídeos, além de manchas azul claras e azul violácea, que sugerem a presença de ácidos fenólicos carboxílicos, como já evidenciado pelos referidos cálculos de Rf citados anteriormente (Figura 1 e 4) (Wagner, Bladt e Zgainski, 2003), corroborando com Mundada e Shivhare, (2010) que destacaram a presença destes compostos em extratos de *T. procumbens*.

Quando observada a CCD dos diferentes extratos de ambas as plantas realizadas para detecção de terpenoides após a revelação, manchas de coloração azul e azul-violácia e violeta foram observadas, demonstrando possível presença de alcoóis, monoterpenos, ésteres e derivados de fenilpropano, sendo que apenas para o extrato aquoso de *O. spectabilis* nenhuma mancha foi verificada (Figura 2 e 5) (Wagner, Bladt e Zgainski, 2003).

Estudos vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais com alto teor de eugenol, cinamaldéido e citral (Lis-Bauchin e Deans, 1998; Cavar et al., 2008), servindo ainda como atrativo para polinizadores e na proteção contra herbivoria (Gleason e Chollet, 2012). Inderjit e Duke (2003) classificaram os terpenoides e compostos fenólicos como os principais grupos químicos associados à atividade fitotóxica. Monoterpenos voláteis de diferentes classes inibem o desenvolvimento e estabilização de plantas. Tal fato é demonstrado pela inibição do crescimento de gramíneas exercida por monoterpenos voláteis liberados de *Salvia leucophylla* (Muller et al., 1964). Entre os monoterpenos os cineoles e seus análogos que são encontrados em muitas espécies têm potencial fitotóxico caracterizado (Vaughn e Spencer, 1993). Romagni et al. (2000) verificaram que o 1,8-cineol alterou negativamente o índice mitótico, sendo que o 1,4-cineol provocou um decréscimo unicamente na fase de prófase, demonstrando que, embora semelhante em estrutura, estes dois cineoles parecem ter diferentes modos de ação.

CCD para a detecção de compostos alcaloídicos foi realizada apenas para os diferentes extratos de *T. procumbens*, pois trabalhos anteriores já haviam relatado a presença deste e outros compostos para esta espécie (Jude et al., 2009; Agrawal e Talele, 2011). Na CCD realizada foram observados após, a revelação, manchas de coloração azul claro e violeta características de compostos alcaloídicos, semelhantes aos observados para os controles (Figura 3) (Wagner, Bladt e Zgainski, 2003).

Alves et al. (2003) em seu estudo isolou solasonina da fração contendo os alcaloides glicosilados totais dos frutos verdes de *Solanum crinitum*, verificando atividade do extrato dos alcaloides glicosilados totais e da solasonina sobre a germinação e o desenvolvimento de

plântulas. Sousa et al. (2012) destacaram em seu trabalho dois alcaloides a anonaina e anonacilina II por apresentar propriedades biológicas incluindo atividade citotóxicas, antimalárica e antimicrobiana. Extratos de *Annona crassiflora* foram caracterizados e dois alcaloides, aterospermidina e liriodenina foram identificados, sobressaindo a atividade antimicrobiana e citotóxica (Gonçalves et al., 2009; Santana et al. 2009).

Estas evidências corroboram os indícios de as alterações cromossômicas encontradas neste estudo sejam possivelmente causadas por compostos químicos presentes nos extratos. Embora estes resultados sugiram que os extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* possuam efeitos inibitórios da mitose e mutagênicos sobre a divisão celular de *A. cepa*, há necessidade de novas investigações genotóxicas, mutagênicas e de outras avaliações de risco em vivo buscando melhor entendimento em benefício do bem-estar humano.

### Agradecimentos

Os autores são gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

### Referências

- A. Akinboro, A.A. Bakare, Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn, J. Ethnopharmacol. 112 (2007) 470–475.
- A. Akintonwa, O. Awodelea, G. Afolayana, H.A.B. Cokerb, Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. J. Ethnopharmacol. 125 (2009) 461-470.
- A. Salehzadeh, A. Akhkha, W. Cushley, R.L.P. Adams, J.R. Kusel, R.H.C. Strang, The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells, Insect Biochem. Mol. Biol. 33 (2003) 681–689.
- A. Taddei, A.J. Rosas-Romero, Bioactivity studies of extracts from *Tridax procumbens*, Phytomedicine. 7 (2000) 235-238.
- A.B. Gadano, A.A. Gumi, M.A. Carballo, Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family, J. Ethnopharmacol. 103 (2006) 246–251.
- A.P.S. Mendes, R.S. Borges, A.M. J Chaves Neto, L.G.M. De Macedo, A.B.F. Da Silva, The basic antioxidant structure for flavonoid derivatives, J Mol Model. 18 (2012) 4073-4080.
- B. Testa, The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics, New York, Academic Press, 1995.
- C.C.F. Alves, J.M. Alves, T.M.S. Silva, M.G. Carvalho, J.J. Neto, atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum*. Lam, Floresta Ambient. 10 (2003) 93 – 97.
- D.C. Santana, et al., Reação do extrato bruto de acetato de etila da *Annona crassiflora* sobre espécies de plantas daninhas. In: simpósio iberoamericano de plantas medicinais, Cuiabá, Anais, Itajaí, Rede Iberoamericana de Estudo e Aproveitamento Sustentável da Biodiversidade Regional de Interesse Farmacêutico, 4 (2009).
- D.I. Olorunfemi, G.E. Okoloko, A.A. Bakare, A. Akinboro, Cytotoxic and genotoxic effects of cassava effluents using the *Allium cepa* assay, Res. J. Mutagen, 1 (2011)1–9.

- D.S. Pinho, R.T. Sturbelle, M.G. Martino-Roth, G.L. Garcias, Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 165-170.
- E.K. Elumalai, M. Ramachandran, T. Thirumalai, P. Vinothkumar Antibacterial activity of various leaf extracts of *Merremia emarginata*, *Asian Pac J Trop Biomed*, 1 (2011) 406-408.
- G. Fiskesjö, Allium test for screening chemicals: evaluation of cytologic parameters. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, New York, 1997.
- H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainski, *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin, Springer, 2003.
- H.M. Appel, Phenolics in ecological interactions, the importance of oxidation, *J. Chem. Ecol*, 19 (1993) 1521-1552.
- Inderjit, S.O. Duke, Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 2003, 217, pp. 529–539.
- J.G. Romagni, S.N. Allen, F.E. Dayan, Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species, *J. Chem. Ecol*, 26 (2000) 303-313.
- J.Q. Yu, S.F. Y, M.F. Zhang, W.H. Hu, Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber, *Biochem Syst Ecol*, 31 (2003) 129-139.
- K. Algariri, K.Y. Meng, I.J. Atangwho, M.Z. Asmawi, A. Sadikun, V. Murugaiyah, N. Ismai, Hypoglycemic and anti-hyperglycemic study of *Gynura procumbens* leaf extracts. *Asian Pac J Trop Biomed* 3 (2013) 358-366.
- K.E. Hammondkosak, J.D.G. Jones, Resistance gene-dependent plant defense responses, *Plant Cell*, 8 (1996) 1773-1791.
- K.F. Gleason, R. Chollet, Isoprenoid compounds (terpenes), in: K.F. Gleason, R. Chollet, *Plant biochemistry*, 1ed, Jones & Bartlett Learning, 2012, pp. 100-118.
- K.G. Kissmann, D. Groth, 1999. *Plantas Infestantes e Nocivas*. 2.ed. São Paulo, BASF, Tomo III. 978
- L. Karaman, F. Sahin, M. Gulluce, H. Ogutcu, M. Sngul, A. Adiguzel. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol.* 85 (2003) 231-235.
- L. Verschaevea, J. Van Staden, Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 575-587.
- M. Idu, *The Plant Called Medicine*, UNIBEN Press, Benin City, Nigeria, 2011.
- M. Lis-Bauchin, S.G. Deans, Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Bacteriol*, v. 82 (1997) 759-762.
- M.A. Gonçalves, T.A. Lara, L.P.S. Pimenta, Alcalóides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart. In: Reunião anual da sociedade brasileira de química. Águas de Lindóia, Anais, São Paulo, Sociedade Brasileira de Química, CD-ROM, 29 (2009).
- M.A. Rahman, T.B. Imran, S. Islam, Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract, *Saudi J Biol Sci.* 20 (2013) 213-225.
- M.F. Knoll, A.C.F. Silva, T.S. CantoDorow, S.B. Tedesco, Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells, *Genet Mol Biol* 29 (2006) 539-542.
- M.P. Souza, M.E.O. Matos, F.I.A. Matos, *Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras*, UFC, Imprensa Universitaria, 1991.

- M.Q. Paulo, E. O. Lima, R.F. Maia, L. Xavier Filho, Atividade antimicrobiana do óleo dos frutos de *Ouratea parviflora* Baill (Ocnaceae), *CCS*, João Pessoa, 8 (1986) pp.1921.
- O. Herrero, J.M. Perez Martin, P. Fernandez Freire, L. Carvajal Lopez, A. Peropadre, M.J. Hazen, Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test, *Mutation Research*, 743 (2012) 20–24.
- O. Timothy, M. Idu, D.I. Olorunfemi, O. Ovuakporie-Uvo, Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv, *S Afr J Bot.* 91, (2014) 71–74, 2014.
- R.B. Mulaudzi, A.R. Ndhkala, M.G. Kulkarni, J.F. Finnie, J. VanStaden, Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases, *J Ethnopharmacol*, 146, (2013) 173–179.
- R. Caritá, M.A. Marin-Morales, Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72, (2008) 722-725.
- R.M. Kumar, K. Masuka, T. Makida, N. Kasuhiko, S. Hiroshi, T. Tojiro, Inhibition of colon cancer (HT-29) cell proliferation by a triterpenoid isolated from *Azadirachta indica* is accompanied by cell cycle arrest and up-regulation of p21, *Planta Med.* 72 (2006) 917–923.
- R.M.G. Silva, V.M. Oliveira, F. Valadares, G.F. Mecina, L.P. Silva, Genotoxic activity and toxicity of *Baccharis trimera* Less. regarding the bioaccumulation of heavy metals, *J. Med. Plant Res*, 6:26 (2012) 4321- 4327.
- R.S. Policegoudra, P. Chattopadhyay, S.M. Aradhya, R. Sivaswamy, L. Singh, V. Vee, Inhibitory effect of *Tridax procumbens* against human skin pathogens, *J. Herb. Med.* 3 (2014) 1-17.
- S. Ćavar, et al, Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils, *Food Chem.* 111 (2008) 648-653.
- S. Christudas, T.M. Kulathivel, P. Agastian, Phytochemical and antibacterial studies of leaves of *Tridax procumbens* L, *Asian Pac J Trop Biomed.*,(2012) S159-S161.
- S. Mundada, R. Shivhare, Pharmacology of *Tridax procumbens* a Weed: Review, *Int.J. PharmTech Res*, 2 (2010) 1391-1394.
- S. Saraf, A. Pathak, V.K. Dixit, Hair growth promoting activity of *Tridax procumbens*, *Fitoterapia*, 62 (1991) 495-498.
- S.F. Vaughn, G. F. Spencer, Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides, *Weed Sci.* 41 (1993) 114–119.
- S.M. Jachak, R. Gautam, C. Selvam, H. Madhan, A. Srivastava, Khan, T. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. *Fitoterapia.* 82 (2011) 173–177.
- S.S. Agrawal, G.S. Talele, Bioactivity guided isolation and characterization of the phytoconstituents from the *Tridax procumbens*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 21 (2011) 58-62.
- V.K. Saxena, S. Albert, b-Sitosterol-3-O-b-D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. *J. Chem. Sci*, 117 (2005) p. 263–266.
- V.S. Subramaniam, S.S. Sankara Subramanian, S. Ramakrishnan, A.G.R. Nair, Isolation of luteolin and glucoluteolin from the flowers of *Tridax Procumbens*, *Curr Sci*, 37, (1968) pp. 465.
- W. Kwankua, S. Sengsai, C. Kuleung, N. Euawong, Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, (2010) 949–954.
- W.H. Muller, C.H. Muller, Volatile growth inhibitors produced by *Salvia* species, *Bull. Torrey Bot Club*, 91 (1964) 327–330.

WHO, World Health Organization, Traditional Medicine Strategy 2002–2005, World Health Organization, Geneva, 2002.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios tanto de pré quanto de pós-emergência e o teste de *Allium cepa* realizados neste estudo com os extratos orgânicos e frações obtidas a partir de partes aéreas de *Tridax procumbens* e folhas de *Ouratea spectabilis* demonstraram a capacidade dos compostos presentes nestes extratos em interferir na atividade fisiológica das sementes e plântulas testes, pois foram observadas alterações de germinação e em seus índices, no comprimento radicular e do hipocótilo e no índice mitótico.

A predominância dos compostos flavonoídicos foi indicada por meio da caracterização fitoquímica dos extratos etanólico e fração acetato de etila de *T. procumbens* e hidroetanólico e fração acetato de etila de *O. spectabilis*, destacando ainda a presença de moléculas do grupo das flavonas para as duas espécies e de compostos possivelmente pertencentes à família das isoflavonas e catequinas para a espécie *O. spectabilis*, corroborando para que as atividades biológicas observadas sejam possivelmente causadas por estes compostos químicos.

Embora estes resultados sugiram que os extratos de *T. procumbens* e *O. spectabilis* possuam efeito inibitório sobre a germinação e desenvolvimento de plantas de alface, assim como efeito inibitório da mitose e mutagênicos sobre a divisão celular de *A. cepa*, há necessidade de novas investigações para uma identificação mais detalhada dos compostos presentes nestes extratos orgânicos e frações, bem como novas avaliações genotóxicas e mutagênicas. Esses estudos adicionais poderão propiciar uma possível obtenção de novas biomoléculas, auxiliando na compreensão das interações químicas entre os vegetais, assim como na obtenção de herbicidas naturais com custo reduzido, evitando, ainda, riscos de contaminação ambiental.